



FACULTAD DE FARMACIA  
ESCUELA DE QUIMICA Y FARMACIA  
LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA

**DETERMINACIÓN DEL EFECTO NEUROPROTECTOR DE  
*TRANS*-RESVERATROL Y ÁCIDO *P*-CUMÁRICO EN CÉLULAS DE  
NEUROBLASTOMA HUMANO SH-SY5Y MEDIANTE LA  
TÉCNICA DE CAPTACIÓN DE ROJO NEUTRO**

Tesis para optar al Título de Químico Farmacéutico

**KATHERINE MARLENE IBACETA ÁLVAREZ**

Director de Tesis: Dra. Rocío Álvarez V.

Co-Director de Tesis: Dr. Raúl Vinet H.

2014

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	iv
<b>ABSTRACT</b>	v
<b>ABREVIATURAS</b>	vi
<b>INTRODUCCIÓN</b>	
<b>Envejecimiento poblacional, realidad a nivel mundial y nacional</b>	1
<b>Enfermedades neurodegenerativas</b>	2
Estrés Oxidativo	3
Excitotoxicidad	4
<b>Desregulación de la homeostasis del Ca<sup>2+</sup></b>	5
<b>Demencia</b>	9
<b>Enfermedad de Alzheimer y dishomeostasis de Ca<sup>2+</sup></b>	10
<b>Polifenoles: Una nueva alternativa terapéutica</b>	13
<b>Resveratrol</b>	14
Resveratrol y neuroprotección	16
<b>Modelo neuronal de estudio <i>in-vitro</i></b>	20
<b>HIPÓTESIS</b>	22
<b>OBJETIVOS</b>	23
<b>MATERIALES</b>	24
<b>METODOLOGÍA</b>	25
<b>RESULTADOS</b>	
<b>Puesta a punto de la técnica de captación de rojo neutro</b>	37
<b>Efecto de la despolarización continua con alto K<sup>+</sup> sobre la viabilidad de células SH-SY5Y</b>	43

<b>Efecto del tratamiento con Glutamato (GLU) sobre la viabilidad de células SH-SY5Y</b>	46
<b>Efecto del tratamiento con Ionomicina (IONO) sobre la viabilidad de células SH-SY5Y</b>	47
<b>Efectos de <i>trans</i>-Resveratrol (<i>t</i>-RV) y ácido <i>p</i>-Cumárico (<i>p</i>-CA) sobre la viabilidad celular</b>	49
<b>Efecto del tratamiento continuo con <i>t</i>-RV y <i>p</i>-CA sobre la viabilidad de células SH-SY5Y frente a muerte inducida por glutamato o ionomicina</b>	51
Efecto protector de <i>t</i> -RV y <i>p</i> -CA en tratamiento continuo frente a muerte inducida por glutamato	51
Efecto protector de <i>t</i> -RV y <i>p</i> -CA en tratamiento continuo frente a muerte inducida por ionomicina	54
<b>Efecto del tratamiento conjunto con <i>t</i>-RV y <i>p</i>-CA sobre la viabilidad de células SH-SY5Y frente a muerte inducida por glutamato o ionomicina</b>	56
Efecto protector de <i>t</i> -RV y <i>p</i> -CA en tratamiento conjunto frente a muerte inducida por glutamato	56
Efecto protector de <i>t</i> -RV y <i>p</i> -CA en tratamiento conjunto frente a muerte inducida por ionomicina	58
<b>Curvas Concentración-Respuesta</b>	59
<b>Efecto de IONO y GLU sobre el incremento de la <math>[Ca^{2+}]_i</math> en células SH -SY5Y</b>	60
<b>DISCUSIÓN</b>	62
<b>CONCLUSIÓN</b>	71
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	72

## RESUMEN

El envejecimiento es el principal factor de riesgo en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas cuya etiopatogenia continúa siendo desconocida y para las que no existen terapias farmacológicas que permitan frenar o revertir su progresión. La hipótesis del calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) postula que aquellos factores que contribuyen a mantener la homeostasis de este ión podrían ser neuroprotectores. En esta tesis se estudió el efecto de *trans*-resveratrol (*t*-RV), y su precursor ácido *p*-cumárico (*p*-CA), sobre la viabilidad de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, muertas por sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por glutamato o ionomicina. La viabilidad celular (VC) fue medida mediante la técnica de captación de rojo neutro. En el tratamiento continuo (24 h de preincubación más 24 h en presencia del insulto de muerte) *t*-RV ( $10^{-10}$  M) protegió a las células frente a glutamato (5 mM), mientras que *t*-RV ( $10^{-12}$  M;  $10^{-10}$  a  $10^{-6}$  M) las protegió frente a ionomicina (2  $\mu\text{M}$ ). Mediante un tratamiento equivalente *p*-CA protegió a las células a todas las concentraciones probadas ( $10^{-12}$  M;  $10^{-10}$  a  $10^{-6}$  M). En ausencia de preincubación (tratamiento conjunto), *t*-RV protegió frente a glutamato (5 mM) a  $10^{-12}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$  M y frente a ionomicina (2  $\mu\text{M}$ ) a  $10^{-12}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$  M, mientras que *p*-CA protegió a  $10^{-12}$ ,  $10^{-10}$  y  $10^{-9}$  M. *t*-RV provocó muerte a concentraciones altas ( $p\text{IC}_{50}$ :  $4,578 \pm 0,1750$  con glutamato 5 mM y  $p\text{IC}_{50}$ :  $4,763 \pm 0,1240$  con ionomicina 2  $\mu\text{M}$ ). Queda pendiente dilucidar los mecanismos por los cuales *t*-RV y *p*-CA fueron capaces de ejercer efectos neuroprotectores. Este trabajo aporta evidencias acerca del potencial de estos fitoquímicos en la prevención y/o tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

## ABSTRACT

Aging is the major risk factor in the development of neurodegenerative diseases whose etiology remains unknown and for which there are no drugs therapies that would curb or reverse it's progression. The hypothesis of calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) propose that those factors that contribute to maintaining the homeostasis of this ion could be neuroprotective. In this thesis the effect of *trans*-resveratrol (*t*-RV) and its precursor *p*-coumaric acid (*p*-CA) were tested on the viability of human neuroblastome cells SH-SY5Y dead by  $\text{Ca}^{2+}$  overload induced by glutamate or ionomycin. Cell viability (VC) was measured by neutral red uptake technique. In the continuous treatment (24 h + 24 h preincubation in presence of toxic stimuli) *t*-RV ( $10^{-10}$  M) protected cells against glutamate (5 mM), whereas *t*-RV ( $10^{-12}$  M;  $10^{-10}$  to  $10^{-6}$  M) protected against death by ionomycin (2  $\mu\text{M}$ ). By an similar treatment *p*-CA protected at all the tested concentrations ( $10^{-12}$  M;  $10^{-10}$  to  $10^{-6}$  M). In absence of preincubation (combined treatment), *t*-RV protected against glutamate (5 mM) to  $10^{-12}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$  M and against ionomycin (2  $\mu\text{M}$ )  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-12}$  M, while *p*-CA protected at  $10^{-12}$ ,  $10^{-10}$  and  $10^{-9}$  M. *t*-RV induced death at high concentrations ( $p\text{IC}_{50}$ :  $4,578 \pm 0.1750$  with 5 mM glutamate and  $p\text{IC}_{50}$ :  $4,763 \pm 0.1240$   $\mu\text{M}$  with ionomycin 2  $\mu\text{M}$ ). It remains to elucidate the mechanisms by which, *t*-RV and *p*-CA were able to exert neuroprotective effects. This work provides evidence about the potential of these phytochemicals in the prevention and / or treatment of neurodegenerative diseases.

**ABREVIATURAS**

*t*-RV=*trans*-Resveratrol

*p*-CA= ácido *p*-Cumárico

[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>= concentración de Calcio intracelular

EN= Enfermedades Neurodegenerativas

ECNT= enfermedades crónicas no transmisibles

EA= Enfermedad de Alzheimer

EAS= Enfermedad de Alzheimer espontánea

EAF= Enfermedad de Alzheimer familiar

ROS= especies reactivas de Oxígeno

SNC= sistema nervioso central

RE= Retículo endoplásmico

IP3R= Receptor de Inositol trifosfato

RyR= receptor de rianodina

SERCA= bomba de Ca<sup>2+</sup> ATP-asa del RE

mPTP= Poro de permeabilidad transitoria mitocondrial

CDDV= Canal de calcio dependiente de voltaje

LCIC= liberación de Ca<sup>2+</sup> inducida por Ca<sup>2+</sup>

CUM= canal uniporte mitocondrial

PPAb= proteína precursora de β-Amiloide

βA= β-Amiloide

PtdS= Fosfatidilserina

IONO= ionomicina

GLU= Glutamato

## **INTRODUCCIÓN**

### **Envejecimiento poblacional, realidad a nivel mundial y nacional**

El envejecimiento de la población es, en la actualidad, un fenómeno de carácter mundial. Lo que empezó como un aumento en la población de adultos mayores en países desarrollados, en el presente es la realidad en muchos países en vías de desarrollo, donde el fenómeno se ha producido comparativamente más rápido (Minsal, 2014). En Chile la población de 60 años y más, corresponde aproximadamente al 13% de la población total, esto quiere decir, que por cada 1 adulto mayor hay 10 menores de 15 años y se espera que para el año 2025 esta proporción cambie a 1 adulto mayor por cada 5 menores de edad (INE, 2007). El envejecimiento demográfico en Chile hoy, es el triple del que había hace 4 décadas, aunque es cuatro veces menor al de países como Japón, donde existen 227 adultos mayores por cada 100 menores de edad. Se espera que para el año 2020 en nuestro país, la población de adultos mayores de 60 años alcance el 17,3% y que la población infanto-juvenil sea del 20,2%, porcentajes que distan mucho de los presentados en el año 2000 donde los adultos mayores conformaban sólo el 10,2%, mientras que la población infanto-juvenil correspondía al 27,8%.

Este cambio demográfico ocurre por una disminución de la fecundidad y un aumento de la esperanza de vida, dando como resultado una disminución de la mortalidad (INE, 2010, MINSAL, 2014). El envejecimiento de la población trae consigo importantes repercusiones a nivel de salud pública, dado el aumento de las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) que trae aparejada. Entre las principales ECNT se encuentran las enfermedades cerebrovasculares, enfermedades cardiovasculares, demencia y enfermedad de Alzheimer, neumonías y cáncer (MINSAL, 2014), que menoscaban la calidad de vida de la población adulta mayor y de sus familias.

Si bien las ECNT han sido asociadas al envejecimiento, el envejecimiento como tal se define como un proceso irreversible que afecta a todos los seres vivos y que se caracteriza

por ser un proceso degenerativo morfofuncional que concluye en la muerte del organismo, definición que excluye las enfermedades asociadas a este proceso (Peinado y cols., 2000, Pérez y Sierra, 2009). Por lo tanto, cuando nos referimos al proceso fisiológico de envejecimiento se excluyen de su definición las enfermedades asociadas, pero se tiene en consideración que es un factor de riesgo importante, especialmente en el caso de las enfermedades neurodegenerativas (EN) (OMS, 2006).

### **Enfermedades neurodegenerativas**

Las EN se caracterizan por la pérdida progresiva de neuronas en áreas específicas del cerebro, desconociéndose en general, las causas de este fenómeno. En la actualidad se conocen más de 100 enfermedades de esta naturaleza, dentro de las cuales se encuentran con mayor frecuencia y/o gravedad la enfermedad de Parkinson (EP), la enfermedad de Huntington (EH), la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), la demencia y la enfermedad de Alzheimer (EA) (Antigüedad, 2004). De acuerdo a la clasificación que realiza la Organización Mundial de la Salud (OMS), los trastornos neurológicos mencionados anteriormente se clasifican como trastornos neuropsiquiátricos, mientras que por otra parte se encuentran los trastornos y/o daños cerebrales con secuelas neurológicas como las enfermedades cerebrovasculares, neuroinfecciones, deficiencias nutricionales o daño neurológico (OMS, 2006).

Si bien se desconoce la etiopatogenia de las enfermedades neurodegenerativas, existen 3 factores, relacionados entre sí, que juegan un papel importante: (1) generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), (2) sobreestimulación de receptores por aminoácidos excitatorios, y (3) desregulación en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático (Gleichmann y Mattson, 2011).

## **Estrés oxidativo**

El estrés oxidativo es un proceso que se genera por el desbalance entre el proceso bioquímico de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y los mecanismos responsables de removerlos (cascada antioxidante). Este es un fenómeno que produce un daño acumulativo en la neurona, el cual es irreparable, ya que oxida biomacromoléculas celulares como lípidos de la membrana, azúcares, proteínas y ácidos nucleicos (Sayre y cols., 2008, Pérez y Sierra, 2009). La principal fuente productora de radicales libres es la mitocondria, producto de la cadena transportadora de electrones y la fosforilación oxidativa.

El sistema nervioso central (SNC) es particularmente sensible al estrés oxidativo, ya que el cerebro es consumidor de aproximadamente un 20% del  $O_2$  del cuerpo y existe una gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados en las membranas de los nervios susceptibles de sufrir un proceso de lipooxidación. La presencia en este tejido de neurotransmisores como dopamina u óxido nítrico con estructuras autooxidables contribuirían a esta condición. Sumado a ello, las defensas antioxidantes presentes a nivel de SNC, tales como la enzima catalasa y super óxido dismutasa, presentan niveles menores que en otras zonas del organismo (Zundorf y Reiser, 2011, Popa-Wagner, Mitran y cols., 2013).

Se ha postulado que, en el proceso de envejecimiento fisiológico, los mecanismos compensatorios no lograrían controlar el estrés oxidativo, dando como resultado un incremento anormal de  $Ca^{2+}$  citoplasmático provocando una disfunción neuronal (Wojda y cols., 2008). Los radicales libres, mediante la oxidación de grupos tioles, modulan proteínas claves para la homeostasis del  $Ca^{+2}$  en el retículo endoplásmico (RE) y la mitocondria, como lo son por ejemplo, el poro permeable transitorio mitocondrial (mPTP), la bomba de  $Ca^{+2}$  ATP-asa del retículo sarcoplásmico (SERCA), el receptor de inositol-3-fostato (IP3-R) y el receptor de rianodina (RyRs) (Sayre y cols., 2008).

Para la mitocondria el estrés oxidativo significa una menor producción de ATP y NADH, lo que disminuye la capacidad respiratoria y aumenta la producción de ROS, provocando además una disminución de la capacidad buffer mitocondrial de  $\text{Ca}^{+2}$  (Gleichmann y Matson, 2011). Por lo tanto, las anomalías en la función mitocondrial se correlacionan fuertemente con la generación de estrés oxidativo y el desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas (Sayre y cols., 2008).

### **Excitotoxicidad**

Los aminoácidos excitatorios son los principales neurotransmisores presentes en la corteza cerebral e hipocampo, y están relacionados con las funciones de aprendizaje y memoria. El aminoácido excitatorio que se encuentra presente en el 70% de las sinapsis excitatorias en el SNC es el glutamato (Corona y Tapia, 2005, Tanovic y Alfaro, 2006, Dong y cols., 2009). Este neurotransmisor posee dos tipos de receptores, los receptores ionotrópicos y los receptores metabotrópicos. Los principales receptores ionotrópicos de glutamato son el *N*-metil-*D*-Aspartato (NMDA),  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propionato (AMPA) y ácido kaínico (KA), los cuales son permeables a cationes. La excesiva activación sináptica mediada por glutamato sobre sus receptores desencadena el fenómeno conocido como excitotoxicidad, en el cual, los receptores de NMDA son considerados como los principales responsables del daño neuronal, debido a su alta permeabilidad a  $\text{Ca}^{2+}$ . Al aumentar los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y aumentar la actividad de enzimas catalíticas, se activa una cascada de eventos que finalmente conduce a apoptosis o necrosis, tales como la despolarización de la membrana mitocondrial, activación de caspasas, producción de ROS y toxicidad celular. También están implicados en el fenómeno de excitotoxicidad los receptores AMPA, carentes de la subunidad GluR2, lo que aumenta la permeabilidad del receptor a  $\text{Ca}^{2+}$ . Por otra parte los receptores metabotrópicos (mGluR), que median respuestas sinápticas lentas y están asociados a proteína G, activan la vía de transducción de señales de IP3, asociada a activación de proteínas kinasas, estimulación de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde almacenes internos

neuronales y activación de procesos de apoptosis (Dong y cols., 2009). Finalmente, cuando el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático (que pareciera ser la instancia final común en ambos casos) es mantenida en el tiempo, el proceso concluye con la muerte/pérdida neuronal (Toescu y Vreugdenhil, 2010).

### **Desregulación de la Homeostasis del $\text{Ca}^{2+}$**

El ion  $\text{Ca}^{2+}$  es un segundo mensajero celular que está involucrado en múltiples funciones neuronales. Por ejemplo, es capaz de regular la liberación de neurotransmisores desde las terminales presinápticas e influye en la plasticidad neuronal contribuyendo al procesamiento de la información y el establecimiento de la memoria. Regula la expresión génica, participa en la excitabilidad de la membrana, en el desarrollo de dendritas, en la sinaptogénesis, entre muchos otros procesos (Kawamoto y cols., 2012).

La homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  está muy bien controlada en la célula. Es así como la concentración extracelular de este ión es aproximadamente de 1,2 mM, mientras que la concentración intracelular es aproximadamente de 100 nM (Gleichmann y Matson, 2011). La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular a la célula se produce a través de canales presentes en la membrana plasmática: i) canales de  $\text{Ca}^{2+}$  activados por ligandos, receptores ionotrópicos (por ejemplo el receptor NMDA activado por glutamato) y ii) canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje (CCDV), siendo este último la principal vía de ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula (Wojda y cols., 2008, Catterall, 2011). Los receptores ionotrópicos se abren en respuesta a la unión de ligandos específicos en el dominio extracelular del receptor. Como ejemplo de este mecanismo encontramos al receptor nicotínico de acetilcolina, receptores ionotrópicos activados por glutamato (NMDA, AMPA, KA, anteriormente mencionados), receptores de serotonina ( $5\text{-HT}_3$ ) y receptores P2X activados por ATP (Kawamoto y cols., 2012). Los CCDV están presentes de forma característica en células excitables y son activados por despolarización de la membrana o por la apertura de canales ionotrópicos, siendo el principal canal de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  el canal dependiente de voltaje tipo-L (CCDV-L o  $\text{Ca}_v1.1\text{-}1.4$ ) (Catterall, 2011). Estos canales

juegan un rol importante en la generación y propagación de impulsos nerviosos y en la homeostasis celular (Wojda y cols., 2008, Zundorf y Reisen, 2011).

Por otra parte, la  $[Ca^{2+}]_i$  puede incrementar a través de su liberación desde dos organelos que sirven como depósito: el retículo endoplásmico (RE) y la mitocondria. La liberación de  $Ca^{2+}$  desde el RE neuronal puede ocurrir a través de dos tipos de canales/receptores: los receptores de rianodina (RyRs) y el receptor de inositol-1,4,5-trifosfato (IP3Rs). El  $Ca^{2+}$  liberado gracias a la activación de IP3Rs requiere de la unión del segundo mensajero IP3, generado por la fosfolipasa C, en respuesta a la activación de receptores acoplados a proteína G o receptores unidos a tirosina kinasa en la membrana celular. El aumento de  $[Ca^{2+}]_i$  gatilla la liberación de  $Ca^{2+}$  via RyRs, fenómeno conocido como liberación de  $Ca^{2+}$  inducido por  $Ca^{2+}$  (LCIC). El proceso de LCIC también es inducido por la activación de CCDV o receptores ionotrópicos, gracias al flujo de iones (Kawamoto y cols., 2012). RyRs también es regulado por factores intraneuronales como el adenosín difosfato-ribosa cíclico (cADP-ribosa), mientras que IP3Rs es regulado por factores como citocromo C, linfoma de células B-2 (Bcl-2), algunas proteínas que unen  $Ca^{2+}$  y el  $Ca^{2+}$  en sí mismo (Wojda y cols., 2008).

En el caso de la mitocondria, el flujo de  $Ca^{2+}$  es muy controlado, ya que a concentraciones fisiológicas de  $Ca^{2+}$  se regula el piruvato, el isocitrato, y la  $\alpha$ -cetolutarato deshidrogenasa, provenientes del ciclo de Krebs, y la producción de ATP. El principal mecanismo de captura de  $Ca^{2+}$  de la membrana externa de la mitocondria es a través de canales de alta conductancia y alta densidad denominados VDACS, mientras que la membrana interna regula la entrada de  $Ca^{2+}$  con el canal uniporte mitocondrial (CUM). Este transportador deja pasar  $Ca^{2+}$  por gradiente electroquímico a través de la membrana, sin el acoplamiento directo de ATP hidrolizado o el transporte de otros iones (Zundorf y Reisen, 2011, Kawamoto y cols., 2012).

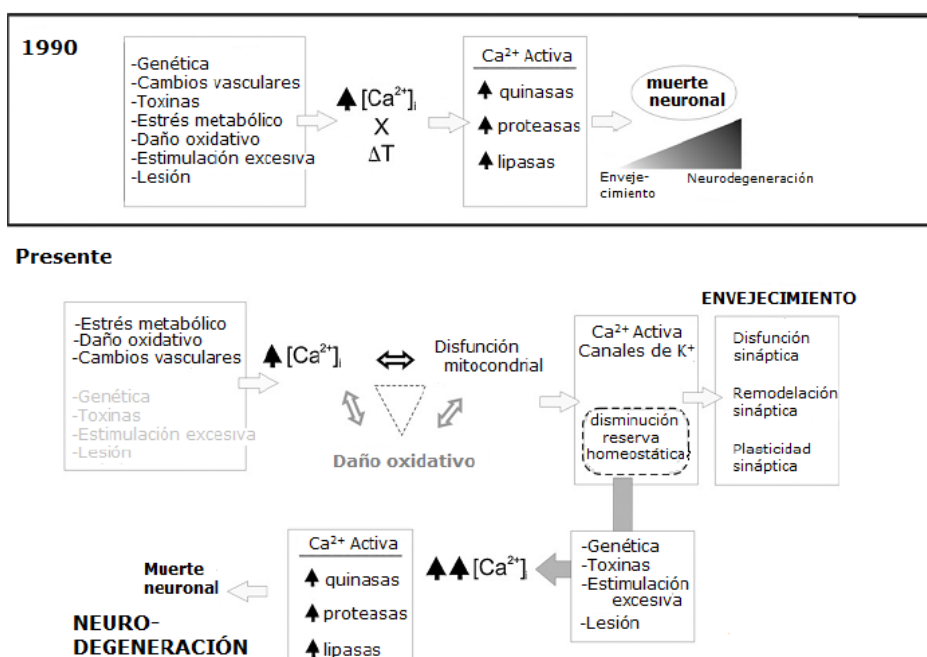
En células excitables, como las neuronas, la salida de  $Ca^{2+}$  desde la matriz mitocondrial ocurre principalmente gracias al intercambiador iónico  $Na^+/Ca^{2+}$ , que saca  $Ca^{2+}$  del interior

gracias al gradiente electroquímico de  $\text{Na}^+$ , y también posiblemente por la apertura de poros de permeabilidad transitoria (mPTP). La apertura de canales mPTP es inducida por la gran cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  en la matriz, la presencia de radicales libres, por la depleción de nucleótidos de adenina, modificaciones en el pH y la disminución del potencial de membrana mitocondrial. Finalmente el transportador uniporte de  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  puede mover  $\text{Ca}^{2+}$  dentro o fuera de la mitocondria dependiendo de la gradiente del mismo ión y de la gradiente de pH (Gleichmann y Matson, 2011, Kawamoto y cols., 2012).

Durante el envejecimiento fisiológico, hay regiones del cerebro, como la región CA1 del hipocampo, donde existe un incremento en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por CCDV, debido a un aumento en su actividad. También la salida de este ión mediada por bombas de extrusión de la membrana plasmática disminuye en neuronas envejecidas. Además existe un aumento en la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RE a través de RyRS e IP3R, mientras que a nivel mitocondrial, hay una mayor despolarización de la membrana, lo que afecta el balance energético y la captura de  $\text{Ca}^{2+}$ . Con la disfunción mitocondrial, hay una disminución de la reserva homeostática que caracteriza a las neuronas envejecidas, lo que resulta en un aumento en su vulnerabilidad (Toescu y Vreugdenhil, 2010). El grado de perturbación de la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  no es suficiente para interrumpir las funciones neuronales normales, pero hace más vulnerables a las neuronas al estrés. Las neuronas envejecidas bajo condiciones estresantes persistentes en el tiempo, son incapaces de prevenir la desregulación de la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  y la generación de enfermedades neurodegenerativas (Wojda y cols., 2008).

Para explicar lo que ocurre con la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  en el envejecimiento fisiológico y patológico, especialmente en las EN, se postuló en los años 90 la llamada “hipótesis del  $\text{Ca}^{2+}$ ”, que planteaba que un incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durante el envejecimiento normal se intensifica en el tiempo, y finalmente genera una pérdida y muerte neuronal. Actualmente esta hipótesis ha sido modificada, centrándose en el hecho de que el envejecimiento fisiológico no está asociado a una gran pérdida neuronal, sino que se encuentra asociado a

cambios morfológicos y funcionales, respondiendo a la triada desregulación del  $\text{Ca}^{2+}$  - disfunción mitocondrial - daño oxidativo lo que disminuiría la reserva homeostática. Esta condición dejaría a las neuronas más vulnerables frente a factores tales como toxinas, estimulación excesiva y lesiones, lo que provocaría un aumento aún mayor en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , provocando muerte neuronal y neurodegeneración (**Fig. 1**). De este modo, en EN el aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular pareciera ser una vía común culmine, a pesar de tener diferentes etiologías y presentar muerte neuronal en diferentes áreas cerebrales (Wojda y cols., 2008, Toescu y Vreugdenhil, 2010).



**Figura 1. Esquema que representa los cambios conceptuales que ha sufrido la “hipótesis del  $\text{Ca}^{2+}$ ” en relación al envejecimiento cerebral.** El panel superior señala que el aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en el envejecimiento conduce a una muerte neuronal que se intensifica con el tiempo. El panel inferior representa de forma esquemática la visión actual de esta hipótesis, donde el envejecimiento no está asociado a una pérdida neta de neuronas sino más bien a cambios a nivel sináptico ocurridos por una desregulación de la triada  $\text{Ca}^{2+}$  – función mitocondrial – producción de radicales libres, lo que produciría la disminución de la reserva homeostática y la consecuente generación de un factor de riesgo importante para la mayoría de las EN (adaptado de Toescu y Vreugdenhil, 2010).

## **Demencia**

Como se mencionó anteriormente, dentro de las EN más importantes se encuentra la demencia, la cual se define como un síndrome de deterioro cerebral global, de carácter cognitivo-conductual, que se caracteriza por la existencia de una perturbación de las funciones corticales superiores, incluyendo memoria, razonamiento, orientación, comprensión, cálculo, capacidad de aprendizaje, lenguaje y juicio (OMS, 2009). Dicho síndrome es usualmente de naturaleza multi-etiológica, espontánea, irreversible y crónica, de curso estacionario o progresivo, que afecta principalmente a las personas mayores de 60 años, siendo la primera causa de discapacidad en esta población (Acosta y cols., 2011).

Existen diversos tipos de demencia, entre las que se encuentra la demencia fronto-temporal, demencia por cuerpos de Lewy, demencia por enfermedad de Parkinson, demencia vascular y enfermedad de Alzheimer (EA), todas con diferentes etiologías clínicas características y progresión de la enfermedad (Acosta y cols., 2011).

La EA es la más común de las demencias y presenta mayor incidencia a partir de los 65 años, duplicándose cada 5 años a partir de esa edad (OMS, 2006). Según el Reporte Mundial de Alzheimer del año 2009, se estima que la población que la padece en todo el mundo alcanza los 35,6 millones de personas, siendo la gran mayoría ancianas y encontrándose las dos terceras partes en países con ingresos bajos y medios. Sin embargo, el futuro no es alentador respecto al padecimiento mundial de Alzheimer, esperándose que para el año 2050 el número de enfermos sea cerca de 115,4 millones de personas (OMS, 2006).

Si se observa la realidad chilena, ella no dista del resto del mundo, encontrándose que el 1,06% de la población (equivalente a 180.000 personas) sufre de Alzheimer, y con el pasar de los años debido al envejecimiento de la población, se espera que esta cifra también aumente (Slachevsky, 2012).

### **Enfermedad de Alzheimer y dishomeostasis de $\text{Ca}^{2+}$**

La EA, al igual que el resto de las EN, se caracteriza por ser de etiopatogenia desconocida y de origen multifactorial. Entre los factores que podrían estar jugando un rol importante en la génesis de esta enfermedad, destacan los de origen genético y los de origen no genético. Dentro del primer grupo se encuentran las mutaciones en genes de: presenilina 1 y 2, proteína precursora de  $\beta$ -amiloide (PPAb), la proteína Alfa-2 macroglobulina, enzima degradadora de la insulina, mieloperoxidasa y de apolipoproteína E. Estas mutaciones se presentan en el Alzheimer de tipo familiar (EAF), cuya aparición es temprana (personas menores de 60 años) y se caracteriza por ser hereditaria, aunque sólo representa al 5% del total de pacientes con Alzheimer.

En la enfermedad de Alzheimer de origen esporádico (EAS), la edad y el proceso de envejecimiento serían los principales involucrados en su patogénesis, existiendo dos hipótesis relacionadas: i) alteración de la función colinérgica y ii) estrés oxidativo. También se encuentra como factor no genético la formación de agregados de la proteína tau hiperfosforilada, que produce degeneración neurofibrilar. Histopatológicamente es posible encontrar tres tipos de lesiones en el tejido cerebral de enfermos de Alzheimer: ovillos neurofibrilares (ONF), neuritas distróficas (ND) y placas neuríticas (PN); estas últimas correspondientes a los depósitos del péptido  $\beta$ -amiloide ( $\beta\text{A}$ ). Junto a ello se encuentra pérdida neuronal y dendrítica, degeneración granulovacuolar, cuerpos de Hirano y atrofia general del cerebro (Aliev, Obrenovich y cols., 2008, Acosta y cols., 2011).

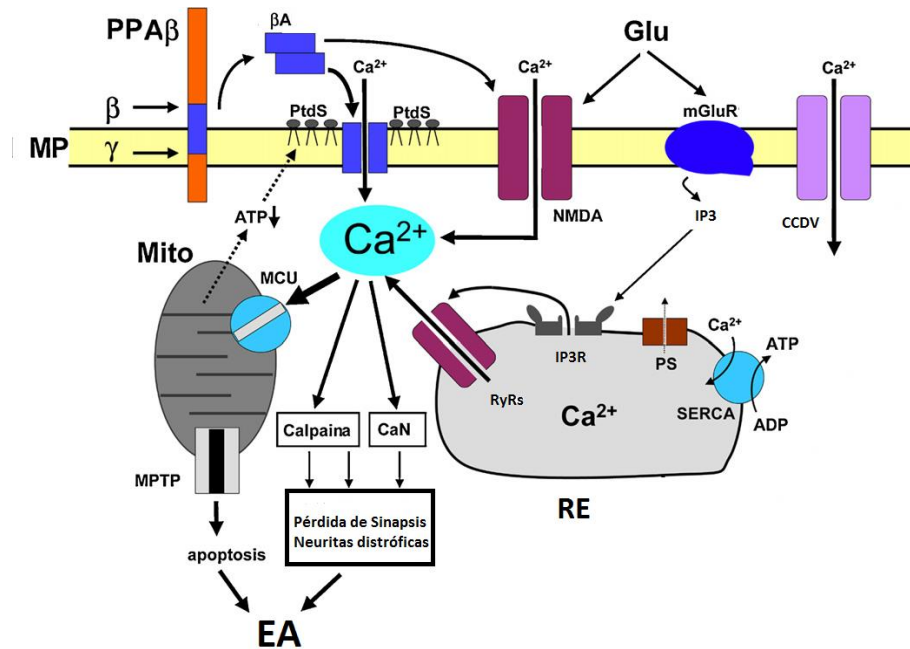
Las áreas del cerebro afectadas en estos pacientes muestran un incremento en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que se relaciona con la evidencia que indica que la etiología de esta enfermedad estaría basada en la interacción entre la dishomeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  y la mutación de los genes 1 y 2 de presenilinas o los marcadores neuropatológicos como la proteína tau hiperfosforilada y el péptido  $\beta\text{A}$  (**Fig. 2**) (Wojda y cols., 2008). Las mutaciones en la proteína precursora de  $\beta\text{A}$  (PPAb) y en los genes de presenilina 1 y 2, producen un cambio en la proteólisis de PPAb por el complejo enzimático  $\gamma$ -secretasa, lo que da como

resultado un incremento en la razón de los fragmentos proteicos de  $\beta$ A 42/40, conduciendo a su agregación y formación de péptidos  $\beta$ A42, los cuales son tóxicos e inducen pérdida de las sinapsis y toxicidad neuronal en la EA. Adicionalmente,  $\beta$ A42 y  $\beta$ A40 forman poros permeables a  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana plasmática, induciendo el aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . La formación del poro es facilitada por la exposición de fosfatidilserina en la superficie de la membrana (PtdS), lo que indica además que la célula entrará en un proceso de apoptosis. Dada la desestabilización del nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, se gatilla la formación de radicales libres, peroxidación de lípidos y apoptosis. Además los péptidos  $\beta$ A pueden modular la actividad de los CCDV y del receptor NMDA, aumentando la excitotoxicidad mediada por este último. Los efectos de la desregulación sostenida de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , son: activación de fosfatasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , activación de calcineurina y atrofia de neuritas. La activación de calcineurina produce profundos cambios en la plasticidad sináptica. El exceso de  $\text{Ca}^{2+}$  también activa proteasas dependientes de este ión como la calpaina la cual degrada enzimas involucradas en el proceso de aprendizaje y memoria (Supnet y Bezprozvanny, 2010, Camandola y Mattson, 2011).

Por otra parte, las presenilinas (PS) modulan la actividad del RE, alterando la captura y liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la bomba SERCA. Como consecuencia, se acumula  $\text{Ca}^{2+}$  en el RE y se mejora su liberación mediante RyRs, receptor que se encuentra incrementado en pacientes con PS-1 mutadas (en pacientes con EAF) (Zundorf y Reisen, 2011). Además PS-1 interactúa con IP3-R, provocando que el canal se abra por más tiempo, lo que a su vez, aumenta la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  (Camandola y Mattson, 2011).

Numerosa evidencia demuestra además que el  $\beta$ A se acumula en la mitocondria, alterando la actividad del complejo III y IV de la cadena respiratoria y aumentando la captura de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de MCU, por lo cual aumenta la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y el estrés oxidativo, reduciendo la producción de ATP, depolarizando la membrana mitocondrial, permitiendo la apertura de mPTP y gatillando el proceso de apoptosis (Camandola y Mattson, 2011, Zundorf y Reisen, 2011). Finalmente, el feedback positivo entre la dishomeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$

y el incremento de la producción del péptido  $\beta$ A, unido a la mutación de las PS, con el tiempo darían como resultado un aumento en la producción de señales de apoptosis y la pérdida neuronal (Wojda y cols., 2008).



**Figura 2. Desregulación de la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  en la EA.** Las secuenciales escisiones de la proteína precursora de  $\beta$ -Amiloide (APP) por las enzimas  $\beta$ -secretasa ( $\beta$ ) y la enzima  $\gamma$ -secretasa ( $\gamma$ ) generan péptidos de  $\beta$ -Amiloide ( $\beta$ A). Estos se insertan en la membrana plasmática formando poros permeables a  $\text{Ca}^{2+}$ . La inserción de estos péptidos en la membrana plasmática facilita la unión de fosfatidilserina (ptdS) en la superficie de la membrana; la disfunción mitocondrial provoca una disminución en la producción de ATP, lo que provoca que ptdS vaya desde el interior de la membrana hacia la superficie exterior de esta. La reducción en los niveles de ATP y la pérdida de la integridad de la membrana causan una depolarización de la membrana, lo que facilita el ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los receptores NMDA y los CCDV.  $\beta$ A puede afectar la actividad de NMDA, AMPA y CCDV directamente. Glutamato estimula la activación de receptores metabotrópicos mGluR, la producción de IP3 y la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RE mediante los receptores de IP3 (IP3-R). La Presenilina (PS) funciona como un canal de fuga en el RE y podría estar modulando la actividad de IP3-R, RyRs y la bomba SERCA directamente. Niveles elevados de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma activan las proteínas calcineurina (CaN) y calpaina, provocando modificaciones en el citoesqueleto neuronal, pérdida de la sinapsis, y distrofia de neuritas. El exceso de  $\text{Ca}^{2+}$  es capturado por el uniportador mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$  (CUM) presente en la membrana externa de la mitocondria, lo que eventualmente permitiría la generación de poros de permeabilidad transitoria (mPTP) y permitiendo que comience el proceso de apoptosis celular. Modificado de Supnet y Bezprozvanny (2010).

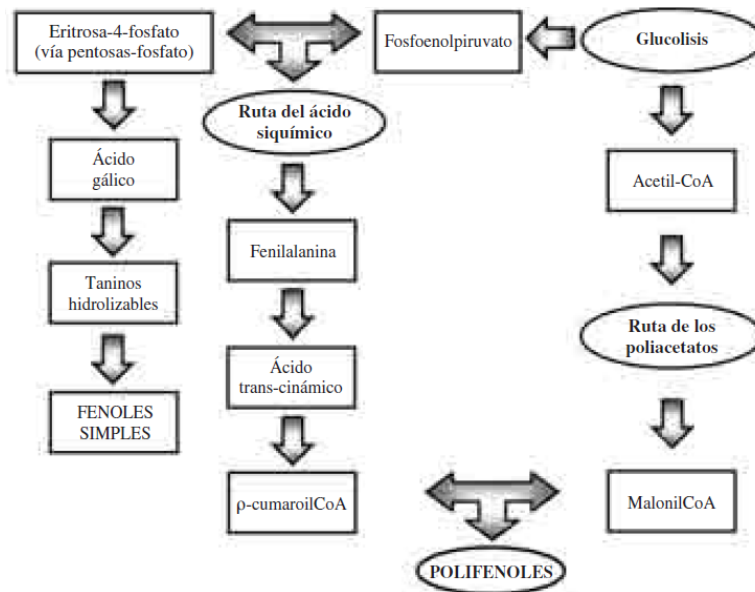
Actualmente, no existen terapias que permita detener la progresión de la EA, por lo que las personas que la padecen solo cuentan con tratamientos para sus síntomas, mediante el uso de fármacos como los anticolinesterásicos (Gandía, Álvarez y cols., 2006) y de agentes moduladores de glutamato, como la memantina (Tanovic y Alfaro, 2006).

Teniendo en cuenta los datos epidemiológicos actuales y las proyecciones a futuro, no solo de Alzheimer, sino que de todas las EN, es necesaria la implementación de nuevas alternativas terapéuticas que reduzcan o prevengan la degeneración neuronal. Bajo este contexto existe una intensa investigación de nuevas moléculas, de diversos orígenes, que permitan desarrollar estrategias terapéuticas innovadoras para estas patologías

### **Polifenoles: Una Nueva Alternativa Terapéutica**

De la enorme cantidad de compuestos (fitoquímicos) que es posible encontrar en las plantas, existe un subgrupo destacado denominado polifenoles. Los polifenoles son producto del metabolismo secundario de las plantas, siendo algunos de ellos indispensables para mantener las funciones fisiológicas vegetales y además son necesarios como sistema de defensa contra noxas y situaciones de estrés (Granado, 2009).

Los polifenoles se pueden clasificar en diversos grupos dependiendo del número de anillos fenólicos presentes en su estructura, donde los principales son los ácidos fenólicos, estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides (Martínez-Valverde y cols., 2000, Granado, 2009, Schaffer y cols., 2012). La biosíntesis de los polifenoles se produce a través de dos rutas: la ruta del ácido shikímico y la ruta de los poliacetatos. La ruta del ácido shikímico es dependiente de la luz, se inicia con la eritrosa-4-fosfato y del fosfoenolpiruvato, donde tras diversas modificaciones se obtiene el ácido shikímico, precursor de la mayoría de los fenoles de origen vegetal (**Fig. 3**).



**Figura 3. Esquema de la ruta biosintética de los polifenoles en las plantas.** (Quiñones y cols., 2012).

Los polifenoles han sido estudiados no solo por estar presentes en abundante cantidad en la dieta, sino que también por presentar propiedades importantes para la salud humana, destacando principalmente su acción antioxidante, aunque numerosos estudios también avalan su actividad como: vasodilatadores y vasoprotectores, antitrombóticos, antilipémicos, antiateroscleróticos, antiinflamatorios y antiapoptóticos; además existen importantes evidencias epidemiológicas que indican que podrían poseer efectos beneficiosos contra enfermedades neurodegenerativas (Quiñones y cols., 2012, Schaffer y cols., 2012).

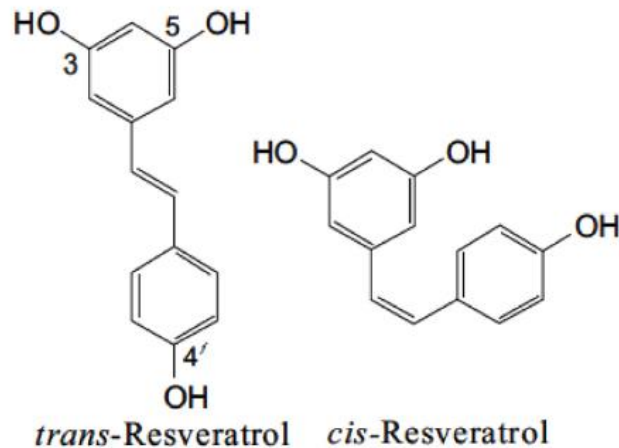
### **Resveratrol**

Resveratrol (RV) es un polifenol que ha adquirido gran importancia en las últimas décadas. El interés por éste ha surgido por los múltiples beneficios que se le ha atribuido al consumo de alimentos que lo contienen. Un ejemplo de ello es lo observado en la población francesa, la cual presenta una baja incidencia en enfermedades

cardiovasculares a pesar de su dieta rica en grasas saturadas, efecto atribuido al consumo moderado de vino tinto (el cual es rico en RV); a este fenómeno se le denominó “Paradoja Francesa” (Renaud y de Lorgeril, 1992). A partir de este hallazgo, aumentó progresivamente el estudio de este polifenol con el fin de caracterizar sus funciones y los mecanismos que ejerce en el organismo.

RV está presente en más de 70 especies de plantas, incluyendo familias tales como *Cyperaceae*, *Dipterocarpaceae*, *Gnetaceae* y *Vitaceae* y en diversos frutos como cacahuates, moras, arándanos y en la uva, estando presente en esta última principalmente en su piel y semillas (Richard y cols., 2011, Gambini, 2013). Pertenece a la familia de estilbenos (3, 5, 4'- trihidroxiestilbeno) correspondiente a un grupo de compuestos cuya estructura de dos anillos aromáticos unidos por un grupo metileno es la responsable de los isómeros de este compuesto. Dentro de estos isómeros se encuentra *cis*-resveratrol y *trans*-resveratrol (*t*-RV) (**Fig. 4**), siendo el isómero *trans* el más abundante y estable, y también el que ejerce la acción biológica por ser más activo (Li y cols., 2012). Otra característica de RV es que pertenece a un grupo de fitoquímicos denominados fitoalexinas, sintetizado por las plantas como un mecanismo de protección contra infecciones, parásitos y otras situaciones causantes de estrés (Gambini y cols., 2013).

A esta molécula se le atribuyen múltiples efectos benéficos para la salud, entre los cuales se encuentra efecto antioxidante, anticancerígeno, antialérgico, antiplaquetario, antiinflamatorios, neuroprotector, y además “tiene la propiedad de prevenir un amplio rango de trastornos como enfermedades cardiovasculares, diabetes, artritis, enfermedades relacionadas con el envejecimiento, isquemia cerebral, daño al DNA, apoptosis y oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL)” (Li y cols., 2012).



**Figura 4. Isómeros de Resveratrol.** Estructura química de *trans* y *cis* – resveratrol. (Rege y cols., 2014).

### Resveratrol y neuroprotección

Entre los efectos benéficos de RV que ha despertado mayor interés es su capacidad de prevención y/o intervención en procesos neurodegenerativos. Uno de los mecanismos atribuidos a la acción neuroprotectora de RV es la activación de genes denominados sirtuinas, los cuales tendrían acciones miméticas a la restricción calórica, la que ha demostrado su eficacia en prologar la vida reduciendo el proceso inflamatorio, la aterosclerosis, los efectos de la edad y la resistencia a la insulina (Harikumar y Aggarwal, 2008).

Existen evidencias que demuestran que RV sería capaz de reducir la secreción de  $\beta$ -amiloide y la formación de los ovillos neurofibrilares; además disminuiría los marcadores histológicos de la EA y desensibilizaría e inhibiría la agregación de los ovillos neurofibrilares. También se ha sugerido que RV podría inhibir la acción de la enzima  $\beta$ -secretasa, implicada en la producción de  $\beta$ -amiloide (Richard y cols., 2011).

A pesar de las numerosas evidencias existentes, el mecanismo de acción de RV no ha sido completamente caracterizado, y son muchas las vías por las cuales ejerce efectos dentro

de los complejos sistemas celulares, activando o inactivando genes, enzimas, canales/transportadores de membrana, tanto por interacción directa, como por acción indirecta (Harikumar y Aggarwal, 2008).

Entre los principales mecanismos por los cuales RV ejercería su acción neuroprotectora se encontrarían su capacidad antioxidante, antiinflamatoria y antiamiloidogénica. Respecto a su capacidad antioxidante, se ha observado que es capaz de atrapar ROS, incrementar los niveles de GSH y mejorar la capacidad antioxidante intrínseca de la célula (induciendo enzimas como la superóxido dismutasa SOD, catalasa y tioredoxina) (Ansari y cols., 2013, Rege y cols., 2014). Además es capaz de suprimir la formación de radicales libres de  $O_2$ , mediante la inhibición de genes pro-oxidativos tales como nicotinamida adenina dinucleotido fosfato oxidasa y mieloperoxidasa. Por otra parte, inhibe la enzima Quinona reductasa-2 (QR2) la cual se encuentra sobreexpresada en el hipocampo de personas con EA, lo que incrementa la resistencia celular contra el estrés oxidativo que induce muerte neuronal. RV también activa a la proteína kinasa dependiente de AMP (AMPK), un regulador clave de la supervivencia celular en respuesta al estrés oxidativo. Además, RV ha demostrado proteger a la mitocondria contra el estrés oxidativo inducido por el ácido araquidónico y hierro, a través de un mecanismo que involucra la fosforilación AMPK dependiente de la glicógeno-sintetasa kinasa-3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) (Bastianetto y cols., 2014). Finalmente RV es capaz de suprimir la producción de iNOS, la cual se ve envuelta en la lipoperoxidación inducida por el péptido  $\beta$ A (Rege y cols., 2014).

La capacidad antiinflamatoria de este polifenol se observa principalmente por la inhibición de moléculas proinflamatorias, como la ciclooxigenasa, particularmente la COX-1. RV es capaz de inhibir la liberación de factores pro-inflamatorios a través de la inhibición de la cascada de señalización que involucra el factor nuclear NF- $\kappa$ B y el activador de proteínas-1 (AP-1). Es capaz de proteger a neuronas dopaminérgicas contra la muerte inducida por LPS, atenuando la activación de proteínas kinasas (AMPKs) y las vías de señalización de NF- $\kappa$ B, dando soporte a la hipótesis que la neuroprotección de RV

involucra la inhibición de la neuroinflamación mediada por la activación de microglías, astrocitos, linfocitos y macrófagos (Bastianetto y cols., 2014, Rege y cols, 2014).

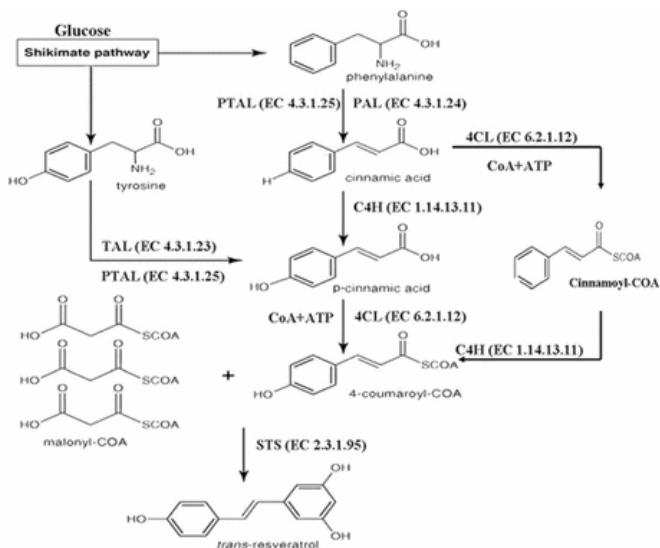
Su actividad antiamiloidogénica hace referencia a la capacidad de RV, y algunos de sus derivados, de interactuar con el péptido  $\beta$ A, inhibiendo y desestabilizando los ovillos neurofibrilares formados por este péptido, aunque algunos autores indican que su efecto directo no es la prevención de la formación de fibras de  $\beta$ A, sino su capacidad de eliminarlo de la célula. Por lo tanto, su efecto antiamiloidogénico es a través de la promoción de su clearance más que la inhibición de su producción (Bastianetto y cols., 2014). También se ha propuesto a RV como una molécula que posee un efecto similar a la restricción calórica, esto gracias a la activación de sirtrinas (SIRT), las cuales se han sugerido como las responsables de aumentar el tiempo de vida y también disminuir la pérdida neuronal. Este efecto explicaría el fenómeno conocido como la paradoja francesa, explicada con anterioridad (Kulkarni y cols., 2014).

A pesar de las numerosas evidencias existentes, el mecanismo de acción de RV no ha sido completamente caracterizado, y son muchas las vías por las cuales ejerce efectos dentro de los complejos sistemas celulares, activando o inactivando genes, enzimas, canales/transportadores de membrana, tanto por interacción directa, como por acción indirecta (Harikumar y Aggarwal, 2008).

En la actualidad se están llevando a cabo ensayos clínicos con RV y su potencial efecto benéfico sobre numerosas enfermedades, dentro de las cuales se encuentra la enfermedad de Alzheimer. El estudio más reciente sobre RV y EA es el realizado por el National Institute on Aging (AIA) y Alzheimer's Disease cooperative study (ADCS) (2011-2014), que lleva por nombre "Phase II study to evaluate the impact on biomarkers of Resveratrol treatment in patient with mild to moderate Alzheimer's Disease" (Estudio de Fase II para evaluar el impacto del tratamiento con Resveratrol sobre biomarcadores en pacientes con Enfermedad de Alzheimer leve a moderada). En este estudio se administró de forma crónica 500 mg de RV a 60 pacientes y placebo a otros 60 pacientes (en forma

aleatoria) con doble ciego, por 52 semanas, con 13 semanas de administración de dos comprimidos diarios, para finalmente medir biomarcadores de la EA en sangre y en líquido cerebrospinal, y adicionalmente medir parámetros farmacocinéticos de RV en 15 pacientes al azar. Este estudio se encuentra finalizado, pero los resultados aún no están disponibles (Fuente: [www.clinicaltrial.gov](http://www.clinicaltrial.gov)).

Las propiedades pleiotrópicas de RV dan pie a que se originen nuevas hipótesis y nuevas funciones y, por ende, posibles usos de este compuesto. El polifenol *t*-RV y su precursor, el ácido *p*-cumárico (*p*-CA), ambos derivados de la ruta del ácido siquímico (**Fig. 5**), se encuentran entre los compuestos más prometedores.



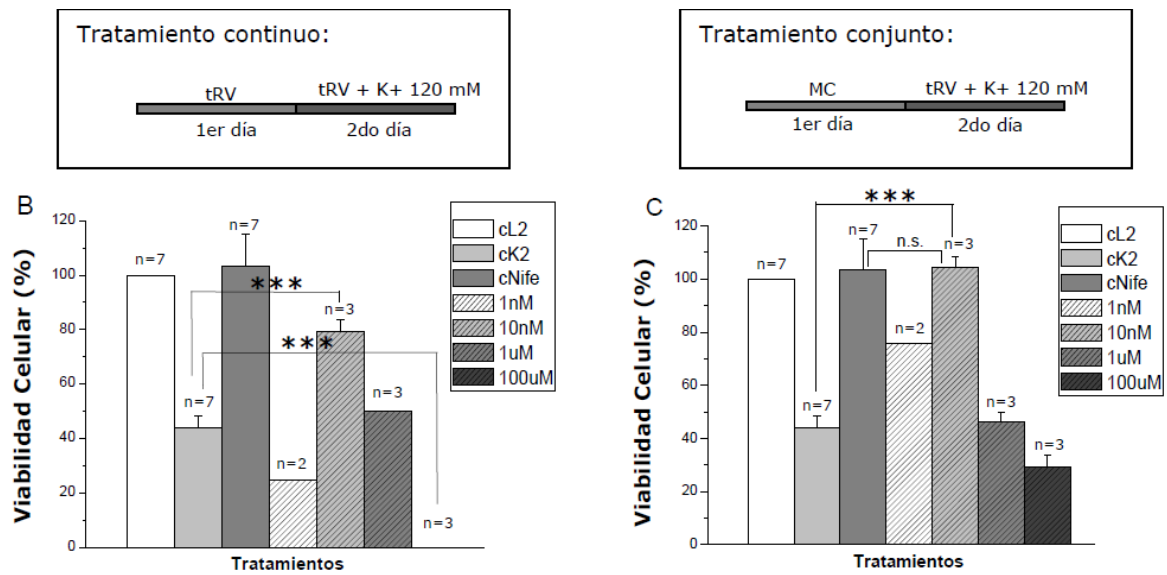
**Figura 5. Vía de síntesis de *trans*-Resveratrol.** *Trans*-Resveratrol, es sintetizado a partir de Fenilalanina o Tirosina, ambas originando 4-cumaril-CoA a través de diversas enzimas incluyendo la enzima fenilalanina amonioliasa (PAL), Tirosina amonioliasa (TAL), Cinamato 4-hidroxilasa (C4H) y 4-cumaril-CoA ligasa (4CL). Finalmente 4-cumaril-CoA es convertido a *trans*-resveratrol en una reacción catalizada por la estilbeno sintasa (STS) (Zhang y cols., 2013).

El ácido *p*-CA ha sido ampliamente evaluado como agente anticancerígeno, además de presentar los efectos comúnmente descritos para los polifenoles (Kilic y Yesiloglu, 2013), sin embargo su potencial efecto neuroprotector no ha sido evaluado.

### **Modelo neuronal de estudio *in-vitro***

La línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y es una sublínea clonada tres veces de las células SK-N-SH, la cual fue obtenida desde la biopsia de un neuroblastoma de origen ganglionar en médula ósea humana en la década del 70. La línea SH-SY5Y se encuentra dentro de los modelos celulares más ampliamente utilizados en el estudio *in vitro* de enfermedades neurodegenerativas, debido a sus propiedades funcionales y bioquímicas neuronales, siendo caracterizada como una neurona con gran similitud con las de tipo dopaminérgicas (Xie, Hu y cols., 2010).

Estudios realizados en la línea celular de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) han demostrado que el tratamiento con *t*-RV a bajas concentraciones (10 nM) disminuye de forma significativa la muerte inducida por incubación crónica con  $K^+$  (120 mM, 24 h), el cual induce una sobrecarga tóxica de  $Ca^{2+}$  en la célula (**Fig. 6**). Este efecto protector de *t*-RV fue similar al inducido por nifedipino, antagonista selectivo de canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje tipo-L en SH-SY5Y (**Fig. 6**) (Cárdenas, 2012).



**Figura 6. Efecto de *t*-RV sobre la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y bajo diferentes condiciones de tratamiento.** YB y YC: muestran el efecto de *t*-RV (1 nM, 10 nM, 1  $\mu$ M, y 100  $\mu$ M) sobre la viabilidad celular en SH-SY5Y de pasaje 16 al 18, incubadas de acuerdo al tratamiento que se indica en el recuadro inserto sobre cada gráfico. Los valores corresponden al promedio  $\pm$  SE. MC: medio de cultivo; n.s: diferencia no significativa; \*\*\*  $p < 0,001$  (*t* de Student's datos no pareados). (Cárdenas, 2012)

Se ha demostrado que la incubación de células SH-SY5Y con glutamato 60 mM/24 h induce un aumento significativo de la  $[Ca^{2+}]_i$  (Zhong-Wei, 2010). Además se ha observado que el tratamiento con glutamato 2 mM/12 h disminuye significativamente la viabilidad celular, induciendo la muerte por apoptosis (Gao y cols., 2008).

A partir de las evidencias que muestran que la línea celular SH-SY5Y es sensible a estímulos asociados a neurotoxicidad, en el presente trabajo, se evaluó *in vitro* y de forma cuantitativa la acción neuroprotectora de *t*-RV y *p*-CA en un modelo neuronal sometido a muerte por elevación tóxica de  $Ca^{2+}$ .

## HIPÓTESIS

Dado que, *t*-RV (10  $\eta$ M) ha demostrado aumentar de forma significativa la viabilidad de células SH-SY5Y sometidas a muerte por sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por alto  $\text{K}^+$  (KCl 120 mM/24h) y que, glutamato (2 mM/12 h) ha demostrado aumentar los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, se espera que *t*-RV sea capaz de proteger a las células SH-SY5Y sometidas a excitotoxicidad aumentando la viabilidad celular. Además, se espera que *p*-CA al presentar una estructura relacionada, pudiera presentar efectos similares.

## OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de *t*-RV y *p*-CA sobre la viabilidad de células SH-SY5Y sometidas a muerte por sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  mediante la técnica de captación de rojo neutro.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Poner a punto la técnica de captación de rojo neutro en células SH-SY5Y mediante espectrofotometría en placas multipocillo.
- 2.- Caracterizar el efecto de la despolarización continua con alto  $\text{K}^+$  (120 mM) durante 24 y 48 horas, en presencia y ausencia de nifedipino, sobre la viabilidad de células SH-SY5Y mediante la técnica de rojo neutro.
- 3.- Caracterizar el efecto del tratamiento con Glutamato (GLU) sobre la viabilidad de células SH-SY5Y mediante la técnica de rojo neutro.
- 4.- Caracterizar el efecto del tratamiento con Ionomicina (IONO) sobre la viabilidad de células SH-SY5Y mediante la técnica de rojo neutro.
- 5.- Cuantificar el efecto del tratamiento continuo con *t*-RV o *p*-CA ( $10^{-12}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  M) (1er día: *t*-RV o *p*-CA; 2º día: *t*-RV o *p*-CA + GLU 5 mM; y 1er día: *t*-RV o *p*-CA; 2º día: *t*-RV o *p*-CA + IONO 2  $\mu\text{M}$ ) sobre la viabilidad de células SH-SY5Y mediante la técnica de rojo neutro y construir la curva concentración-respuesta.
- 6.- Cuantificar el efecto del tratamiento conjunto con *t*-RV o *p*-CA ( $10^{-12}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  M) (2º día: *t*-RV o *p*-CA + GLU 5 mM; y 2º día: *t*-RV o *p*-CA + IONO 2  $\mu\text{M}$ ) sobre la viabilidad de células SH-SY5Y mediante la técnica de rojo neutro y construir la curva concentración-respuesta.
- 7.- Evaluar el efecto de Ionomicina y Glutamato sobre el incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en células SH-SY5Y.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### MATERIALES

#### REACTIVOS

- Ácido plurónico, Azul de Tripán (0,4%), Medio de Cultivo DMEM, Suero Fetal Bovino (SFB), Tripsina-EDTA, de GIBCO™ (Grand Island, N.Y., Estados Unidos).
- $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , D-Glucosa, Etanol Absoluto, KCl,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ , NaCl y  $\text{NaHCO}_3$ , de MERCK (Darmstadt, Alemania).
- Ionomicina y DMSO, de CALBIOCHEM (Darmstadt, Alemania).
- Etanol absoluto, Polilisina, Resveratrol, Glutamato, Nifedipino y Rojo Neutro, de SIGMA ALDRICH® (Schnelldorf, Alemania).
- Ácido Acético Glacial, HEPES ácido y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , de FISHER SCIENTIFIC (New Jersey, Estados Unidos).
- Antibióticos Pen-Strep-Ampho Solution, de BIOLOGICAL INDUSTRIES® (Beit-Haemek, Israel).
- HCl 37%, de JT BAKER® (Center Valley, Pennsylvania, Estados Unidos).
- Fluo-3AM, de MOLECULAR PROBES® (Eugene, Oregon, Estados Unidos).
- NaOH, de LabGuard® (Edo. de Méx., México).
- Ácido p-Cumárico, fue gentilmente donado por la Dra. Leda Guzmán, académico de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.
- MK-801, fue gentilmente donado por el Dr. Marco Fuenzalida, académico de la Universidad de Valparaíso.

#### SOLUCIONES

- Solución de PBS (en mM): NaCl 150;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  6,5 y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3,4. pH 7,4.

- Medio de Cultivo: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) alta glucosa 4,5 g/L, suplementado con 3,7 g/L de  $\text{NaHCO}_3$ , 10% Suero Fetal Bovino (SFB) y 1% de antibióticos (penicilina-estreptomicina-anfotericina). pH 7,4.
- Medio alto  $\text{K}^+$ : medio de cultivo DMEM suplementado con 3,7 g/L de  $\text{NaHCO}_3$ , 5% SFB, 1% mezcla de antibióticos y KCl concentraciones 120, 70, 50 y 35 mM. pH 7,4.
- Medio de congelamiento: medio de cultivo DMEM completo con 5% (v/v) DMSO.
- Solución Stock Rojo Neutro: 40 mg de Rojo Neutro disueltos en 10 mL de PBS, para obtener una concentración final de 4 mg/mL, filtrado con filtro de 0,22 $\mu\text{m}$ .
- Medio Rojo Neutro: dilución de stock de rojo neutro en medio de cultivo sin SFB (1:80), concentración final 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Preparado 24 horas previas a su utilización, almacenado en atmósfera controlada de  $\text{CO}_2$  (5%) y a 37°C.
- Solución de Extracción (etanol-ácido), Etanol Absoluto (50%), Agua desionizada (50%) y Ácido acético glacial (1%).
- Fluo-3 AM: 50  $\mu\text{g}$  disueltos en ácido plurónico 0,094% y diluido con solución de Locke normal. Concentración final 7  $\mu\text{M}$ .
- Solución Locke Normal, en mM: NaCl 135; KCl 5,6;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2,5; HEPES ácido 10;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  1,2; D-Glucosa 5,5. pH 7,42
- Solución alto  $\text{K}^+$  (en mM): NaCl 20,6; KCl 120;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2,5; HEPES ácido 10;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  1,2; D-Glucosa 5,5. pH 7,42.

### LÍNEA CELULAR

- Células de Neuroblastoma Humano SH-SY5Y.

La línea celular fue adquirida de la European Collection of Authenticated Cell Culture (ECACC) en pase 14 (SIGMA ALDRICH®, Schnelldorf, Alemania).

### HERRAMIENTAS FARMACOLÓGICAS Y COMPUESTOS DE ESTUDIO

- Nifedipino (nife).

Nifedipino fue disuelto en DMSO a una concentración 10 mM (Stock madre), se mantuvo protegido de la luz, alicuotado y almacenado a una temperatura de -20°C. Para su utilización, se realizó una dilución del stock madre en medio de cultivo con 5% SFB (1:1000) para obtener una concentración final requerida de 10 µM.

- Glutamato (GLU)

Glutamato fue disuelto en HCl 1N a una concentración de 500 mM (Stock madre) y se mantuvo a 4°C. Para su utilización, se realizó una dilución de 1:100 en medio de cultivo con 5% de SFB para alcanzar una concentración final de 5mM.

- MK-801

Mk-801 fue almacenado a 4°C, disuelto en DMSO a una concentración de 10<sup>-2</sup>M (stock madre). Para su utilización, se realizó una dilución del stock madre en medio de cultivo con 5% SFB, para obtener una concentración final de 10µM.

- Ionomicina (IONO)

Ionomicina se disolvió en DMSO a una concentración 2,5 mM (Stock madre), se mantuvo estrictamente protegido de la luz y almacenado a 4°C. Para su utilización, se realizó una dilución del stock madre en medio de cultivo con 5% SFB, para obtener una concentración final de 2µM.

- *Trans*-Resveratrol (*t*-RV) y Ácido *p*-Cumárico (*p*-CA).

Tanto *trans*-resveratrol y ácido *p*-cumárico, fueron disueltos en Etanol absoluto a una concentración 10 mM (Stock madre), *t*RV se mantuvo protegido de la luz y ambos fueron almacenados a -20°C. Para su utilización, se realizaron diluciones seriadas para obtener las concentraciones requeridas (100, 10, 1 µM y ηM; 100, 1 pM) en medio de cultivo suplementado con 5% de SFB.

## EQUIPOS

- Agitador orbital de placas, modelo OS-200 (Hangzhou Allsheng Instruments CO. LTD, China).
- Agitador Vortex Genie™, modelo K550-GE (Bender y Hobein, Zürich, Suiza).
- Autoclave Modelo HL-340 (HUXLEY, Taiwan)
- Balanza analítica (METTLER, Waagen Strathausen KG, Alemania).
- Balanza granataria (LT Series Electronics, Tianliang Instruments CO.,LTD, China)
- Baño termorregulado (Cientec, Santiago, Chile)
- Cámara CCD LEICA modelo DFC 360FX (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania)
- Campana de Flujo laminar (Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl, Alemania)
- Centrífuga Heraeus Christ Minifuge 2 (Heraeus Medical GmbH, Wehrheim, Alemania)
- Controlador Electroválvulas (Segainvex, Universidad Autónoma de Madrid UAM, España)
- Estufa (Heraeus Medical GmbH, Wehrheim, Alemania)
- Incubador CO<sub>2</sub> (THERMOFORMA 311, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos)
- Lector de Placas (VarioSkan Flash, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos)
- Microscopio NIKON eclipse TE200 (Nikon Corporation, Tokio, Japón)
- Microscopio Invertido NIKON Eclipse E600 (Nikon Corporation, Tokio, Japón)
- pHmetro, modelo CG805 (Schott-Geraete GmbH, Alemania)

## OTROS MATERIALES

- Frasco de Cultivo T25 y T75, tubos de centrifugación 15 y 50 mL, placas multipocillo FALCON N°353072 (Corning Lifesciences, California, Estados Unidos)

- Micropipetas 2, 200 y 1000 uL Axyper (Thistle Scientific, Reino Unido)
- Repipeteador CAPP Rhythm, Serie 61219 (CAPP ApS DENMARK, Estados Unidos)
- Pipeteador Swiftpet (I.C.T.SL, España)
- Viales plásticos de 1,5 y 2 mL (Zellen, Alemania)

## **METODOLOGÍA**

### **Mantenimiento de la línea celular SH-SY5Y**

La línea celular utilizada es de origen humano, obtenida desde médula ósea. Es un tipo celular epitelial correspondiente a un neuroblastoma. Se denomina con las siglas SH-SY5Y y fue utilizado en esta investigación como modelo *In vitro*. La línea celular fue adquirida de la ECACC. Para la realización de los experimentos de este trabajo fueron utilizadas desde el pase 18 al pase 27.

#### Descongelamiento

Para asegurar un alto nivel de viabilidad celular, el proceso de descongelamiento debe ser rápido y en condiciones asépticas.

Para descongelar se agitó el vial suavemente en un baño de agua a una temperatura de 37°C, manteniendo la parte superior del vial fuera del agua para evitar contaminación del contenido. Este proceso se realizó en un breve período de tiempo, preferentemente en menos de 3 minutos.

Una vez que el contenido del vial se descongeló completamente, las células se transfirieron a un frasco de cultivo con medio de cultivo completo (DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino más Antibióticos) y se incubó a 37°C en atmósfera controlada con 5% de CO<sub>2</sub> y humedad. Al día siguiente se realizó un cambio de medio con el fin de eliminar el DMSO del medio de congelamiento.

### Procedimiento de traspaso y siembra

Las células SH-SY5Y tienen como característica principal el crecer mayoritariamente adheridas al frasco de cultivo y en menor cuantía, suspendidas en medio de cultivo (flotantes), por esta razón, se conservó el medio del frasco de cultivo para recuperar éstas últimas mediante centrifugación.

Para obtener las células adheridas al frasco, primero se lavó con solución PBS por algunos segundos, para eliminar rastros de suero, luego se adicionó 1 a 2 mL de solución de tripsina-EDTA y se dejó actuar por 3 minutos a 37°C. Transcurrido ese tiempo, se sacó del incubador y se golpeó el frasco suavemente con la palma de la mano, para despegar completamente las células, estas fueron resuspendidas en medio de cultivo con suero al 10% (con el fin de inactivar la acción de la enzima), se agregaron las células flotantes recuperadas anteriormente, se centrifugaron a 1500 rpm por 10 minutos, se realizó el recuento celular y finalmente se dispensaron en nuevos frascos de cultivos con 5 mL de DMEM con 10%SFB. Se sembró preferentemente entre  $5 \times 10^4$  a  $1 \times 10^5$  células /cm<sup>2</sup>.

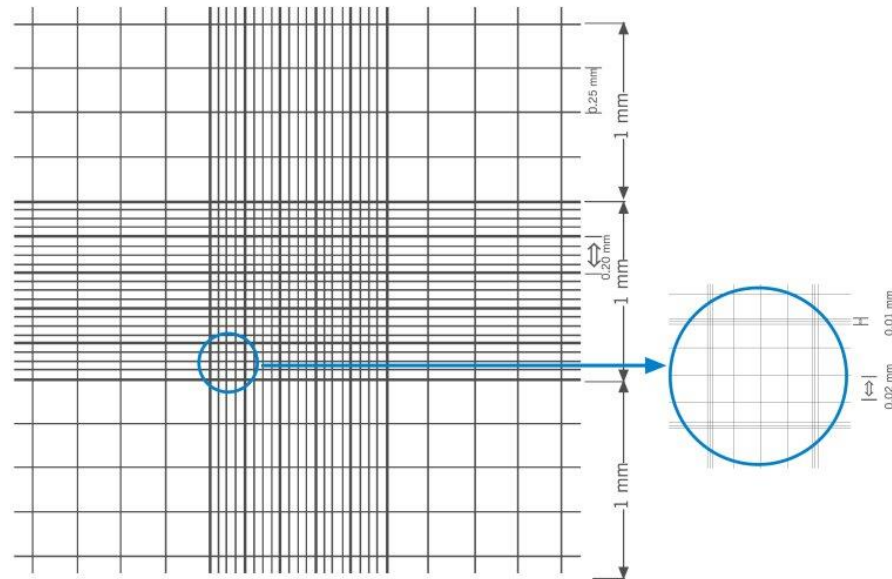
Este procedimiento se repitió cada vez que el crecimiento celular en los frascos de cultivo alcanzó un 80% de confluencia. El medio de cultivo fue reemplazado por medio fresco día por medio.

- Recuento Celular

El recuento celular se realizó en cada procedimiento de traspaso para obtener el número total de células por frasco de cultivo. Esto se llevó a cabo con la utilización de un hemocitómetro o Cámara de Neubauer (SIGMA, product information).

Para ello, se preparó una dilución de 100 µL de azul de tripán más 100 µL de suspensión de células (factor de dilución=2), ésta se agregó con micropipeta al espacio delimitado entre el cubreobjeto y la superficie de la cámara (de 0,1mm de profundidad). Gracias a las cuadrículas dibujadas en el centro de la cámara, se realizó el conteo de 4 esquinas de esta,

de 16 cuadros cada una, tal como se observa en la siguiente figura, y bajo observación en microscopio (**Fig. 7**).



**Figura 7. Cámara de Neubauer.**(Sigma-Aldrich, 2010)

Se debe tener en consideración que cada esquina del hemocitómetro representa un volumen total de  $0,1 \text{ mm}^3$  (0,0001 mL), por lo tanto:

$$\text{Células/mL} = \text{promedio del recuento por esquina (4) x 2 (factor de dilución) x } 10^4$$

$$\text{Total de células} = \text{células/mL x volumen total de medio}$$

### Criopreservación

Para congelar fue necesario mantener las células en medio de cultivo completo suplementado con 5% (v/v) de DMSO. Generalmente se congela un número estandarizado de células ( $1 \times 10^6$  /mL en cada vial). Una vez que se tuvo preparada la suspensión, las células fueron congeladas por una hora a  $-20^\circ\text{C}$  y luego a pasaron a  $-80^\circ\text{C}$ . Cabe destacar

que el congelamiento óptimo se realiza en la fase vapor de nitrógeno líquido y su almacenamiento perdura por aproximadamente un año (fuente: ECACC).

## DISEÑO EXPERIMENTAL

### Ensayo de viabilidad

Los compuestos *t*-RV y *p*-CA fueron aplicados en cada placa de acuerdo al siguiente diseño experimental y a las siguientes concentraciones: ( $10^{-12}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  M).

**Tabla 1: tratamiento de células SH-SY5Y con *t*-RV y *p*-CA**

<b>Grupo Experimental</b>	<b>Tratamiento</b>	
	<b>Día 1 (24 h)</b>	<b>Día 2 (+24 h)</b>
Control de Solvente	MC 5% SFB	HCl (en caso de GLU)
Blanco	MC sin suero	MC sin Suero + Etanol ácido
Control de Viabilidad	MC 5% SFB	MC5%SFB
Control de Muerte	MC 5% SFB	K <sup>+</sup> 120 mM GLU 5 mM IONO 2 μM (x 3 h)
Control de Bloqueo		* Nife + K <sup>+</sup> 120 mM / *MK801 + GLU 5 mM
Tratamiento Continuo	<i>t</i> -RV o <i>p</i> -CA	<i>t</i> -RV (o <i>p</i> -CA) + K <sup>+</sup> 120 mM/ <i>t</i> -RV (o <i>p</i> -CA) + GLU 5 mM <i>t</i> -RV (o <i>p</i> -CA) + IONO 2 μM (x3h)
Tratamiento Conjunto	MC 5% SFB	<i>t</i> -RV (o <i>p</i> -CA) + K <sup>+</sup> 120 mM/ <i>t</i> -RV (o <i>p</i> -CA) + GLU 5 mM <i>t</i> -RV (o <i>p</i> -CA) + IONO 2 μM (x3h)

MC: Medio de Cultivo, GLU: Glutamato; IONO: Ionomicina; Nife: Nifedipino; *t*-RV: *trans*-Resveratrol; *p*-CA: ácido *p*-cumárico.

\* Incubación previa de 30 minutos con Nifedipino o MK801, según corresponda.

### **Fundamento de la técnica Captación de Rojo Neutro**

La viabilidad/citotoxicidad de compuestos puede ser abordada a través de pruebas cuyo fundamento es la absorción de colorantes supravitales. Para evaluar el efecto de los compuestos polifenólicos se utilizó el ensayo de captación de rojo neutro (NRU) el cual se basa en la detección de los daños que producen los compuestos tóxicos sobre la integridad de la membrana lisosomal en las células y sobre el control del flujo del colorante a través de la misma (Babich y Borenfreund, 1992). Este colorante catiónico débil penetra las membranas celulares por difusión pasiva no iónica y se concentra en los lisosomas, donde establece uniones hidrofóbicas electrostáticas con grupos aniónicos o grupos fosfato de la matriz lisosomal. Las células viables serán capaces de incorporar el colorante supravital rojo neutro. Posteriormente, el colorante es extraído de las células viables utilizando una solución de etanol acidificada y se cuantifica la absorbancia del colorante soluble mediante un espectrofotómetro, a 540 nm de longitud de onda. La captación de rojo neutro depende de la capacidad celular de mantener las gradientes de pH mediante la producción de ATP. Cuando la célula muere, se reduce la gradiente de pH y el colorante no puede ser retenido. En consecuencia, la cantidad de colorante retenido es proporcional al número de células viables (Repetto y cols. 2008).

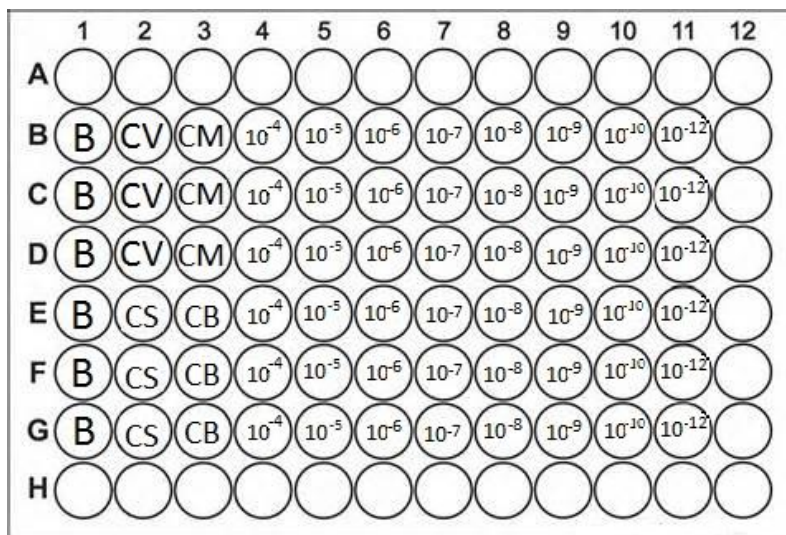
#### Procedimiento

*Día 1. Siembra:* Las células suspendidas en medio de cultivo DMEM con 5% SFB, fueron sembradas de forma homogénea en placas de cultivo de 96 pocillos a una densidad de  $2 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}/100 \text{ uL}$  por pocillo. Una vez realizada la siembra, las placas se incubaron a 37°C, en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 100 % humedad durante toda la noche hasta alcanzar una confluencia de entre un 40 – 60% (Borenfreund y Puerner, 1985).

*Día 2 Tratamiento:* Todas las soluciones fueron preparadas en condiciones de esterilidad e inmediatamente antes de ser usadas para así evitar problemas de estabilidad y precipitación de compuestos. Se prepararon en medio de cultivo DMEM con 5% SFB.

El primer día de tratamiento se realizó según lo establecido en la tabla 1, es decir, para el tratamiento continuo, se realizó la incubación con *t*-RV o *p*-CA, según correspondía, 1 hora posterior al sembrado.

En condiciones de esterilidad, se aspiró el medio de cultivo de la placa y se rellenó los pocillos de acuerdo al diseño descrito más adelante (**Fig. 8**). Se adicionaron 100  $\mu$ L de Medio de cultivo sin SFB más solución etanol ácida (pocillos sin células) a la fila 1 desde B a G, correspondiente al blanco. En la fila 2 desde B a G se agregaron 200  $\mu$ L de Medio de cultivo suplementado con 5% SFB como Control de Viabilidad. En la fila 3 desde B a D se agregó 200  $\mu$ L de Medio de cultivo con IONO 2  $\mu$ M o GLU 5mM (según correspondiese) como Control de Muerte y desde E a G se adicionó Medio de Cultivo GLU 5 mM más MK-801, respectivamente, como control de Bloqueo o de protección, en el caso de Ionomicina 2  $\mu$ M no hay control de bloqueo, por lo tanto se adicionó en la fila 3 desde B a G. En las siguientes filas, de 4 a 11, se adicionaron 200  $\mu$ L de Medio más el insulto de  $K^+$ , Glutamato o Ionomicina con *t*-RV (o *p*-CA) en orden decreciente de concentraciones. Las placas fueron incubadas de acuerdo al diseño experimental previamente descrito.



**Figura 8. Diseño de placa** B: Blanco; CV: Control de Viabilidad; CS: Control de Solvente; CM: Control de Muerte ( $K^+$ , GLU o IONO); CB: Control de Protección o Bloqueo (Nifedipino ó MK801); Concentraciones decrecientes de *t*-RV o *p*-CA en Molar.

El día previo a la realización del ensayo de viabilidad, se preparó una solución de Rojo Neutro, la cual consiste en una dilución entre Medio de Cultivo sin SFB y la solución stock de rojo neutro en una proporción 1:80, dando como concentración final del colorante 50µg/mL. Esta se mantiene toda la noche en condiciones de cultivo (a 37°C con atmósfera controlada), hasta el momento de su utilización (Borenfreund, Babich y cols., 1988)

*Día 3 Ensayo de captación de rojo neutro (NRU):* Se centrifugó la solución de trabajo de rojo neutro a 2000 rpm por 20 min para remover los posibles cristales de colorante que hayan precipitado.

Se aspiró el contenido de cada pocillo de la placa, se lavó con 200 µL PBS, con el fin de eliminar posibles restos de SFB, y se adicionaron 200 µL de solución de rojo neutro a cada uno de ellos. Se incubó la placa por 2,5 h bajo las condiciones apropiadas para el cultivo, tras lo cual se removió la solución de rojo neutro. Las células nuevamente fueron lavadas con 200 µL de PBS por pocillo para eliminar cristales precipitados del colorante. Posteriormente se adicionaron 200 µL por pocillo de la solución de extracción (solución etanol ácida). Luego la placa se llevó a un agitador orbital por 20 min a 150 rpm hasta observar una solución homogénea de rojo neutro extraído de las células. Para finalizar, se midió la absorbancia del rojo neutro extraído de las células a 540 nm en el lector de placas VarioSkan, a través del software SkanIt 2.4.3 (Thermo Fisher Scientific).

### **Medición de Calcio Citosólico**

Para determinar el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico se utilizó el indicador fluorescente Fluo-3 AM (Minta y cols., 1989) el cual tiene una longitud de onda de excitación/emisión de 506/526 nm. Las células sembradas en cubreobjetos de 6 mm tras 2- 4 días de cultivo fueron lavadas con solución de Locke normal 2 o 3 veces y cargadas con Fluo-3 AM durante 30-60 min a 37°C, período en el cual este indicador, permeable a la membrana plasmática, es hidrolizado intracelularmente obteniéndose moléculas quelantes específicas para  $\text{Ca}^{2+}$  (Minta y cols, 1989). Pasado este tiempo, las células fueron nuevamente lavadas con solución de Locke

normal y colocadas dentro de una microcámara metálica de perfusión que se ajusta a la base de un microscopio de epifluorescencia. El estímulo fue aplicado mediante un sistema de válvulas con solenoide miniatura excluyente, operado manualmente y acopladas a una pipeta de perfusión de múltiples vías con una punta de salida común, la cual se posicionó aproximadamente a menos de 100  $\mu\text{m}$  del grupo celular previamente fijado en el plano visible del microscopio. La velocidad de este sistema de perfusión es consecuencia de la presión por gravedad ejercida sobre el líquido así como de las características de la pipeta empleada, alcanzando un reemplazo completo en el entorno de la célula en menos de un segundo (s). La medición de la variación del nivel basal de  $\text{Ca}^{2+}$ , correspondiente a la señal emitida por este grupo celular, fue captada mediante un objetivo de inmersión para fluorescencia (Objetivo Nikon 40X; 0,80 w Fluo). En cuanto a la excitación de Fluo-3 AM, se utilizó una luz de mercurio de 100 W filtrada a una longitud de onda de 490 nm de excitación y 530 nm de emisión y captada por una cámara CCD (Leica, Alemania). Los datos obtenidos fueron almacenados en el disco duro mediante el programa LAS Core Versión 4.1.0 (Leica Microsystems CMS, Suiza) y analizados posteriormente mediante el programa ImageJ Versión 1.48 (Wayne Rasband, National Institute Of Health, USA).

Los resultados se expresan como amplitud de la respuesta, ocupando para ello la siguiente ecuación (Takahashi, Camacho y cols., 1999):

Donde:

$$\Delta F/F = (F-F_b)/F_b$$

$F$  = Intensidad de la fluorescencia del indicador de  $\text{Ca}^{2+}$

$F_b$  = Intensidad de la fluorescencia del indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  antes del estímulo

### **Confeción de curvas concentración-respuesta.**

Para determinar la concentración inhibitoria 50% ( $\text{IC}_{50}$ ) de los fitoquímicos ensayados, se realizó una regresión no lineal utilizando la ecuación logística de cuatro parámetros (4PL). Tanto para el cálculo de la  $\text{IC}_{50}$  como para el análisis estadístico, se utilizó el programa Prism GraphPad versión 6.0 (GraphPad Software Inc., USA)

### **Análisis Estadístico**

Los resultados corresponden al Promedio (M)  $\pm$  error estándar (S.E.), con “n” indicando el número de células registradas bajo las mismas condiciones y provenientes de a lo menos 3 pases diferentes. Las diferencias estadísticas fueron analizadas mediante la prueba *t* de Student’s o ANOVA según correspondiese. Como criterio indicador de diferencia estadística significativa se consideró un valor de *p* menor a 95% ( $p < 0.05$ ).

## **RESULTADOS**

El primer objetivo experimental de este trabajo fue establecer un modelo de muerte celular mediado por  $\text{Ca}^{2+}$  sobre el cual evaluar el potencial efecto neuroprotector de *t*-RV y *p*-Ca. Con este fin se buscó reproducir los resultados obtenidos por Cárdenas (2012), utilizando esta vez una técnica cuantitativa para la determinación de viabilidad. Para ello se comenzó por poner a punto la técnica de medición de viabilidad por captación de rojo neutro.

### **1.- Puesta a punto de la Técnica de Captación de Rojo Neutro**

La puesta a punto de la técnica de captación de rojo neutro se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones de dos protocolos. El primer protocolo consultado fue el de Repetto y cols. (2008), del cual se obtuvo información sobre la preparación de las soluciones necesarias para la realización de la técnica, el tiempo de incubación con el colorante y los volúmenes recomendados para la placa de 96 pocillos.

El segundo protocolo consultado fue el de Borenfreund y cols. (1985), pioneros en la realización de la técnica.

#### **1.1.- Densidad celular y condiciones de sembrado**

Para implementar el ensayo de viabilidad las células SH-SY5Y fueron sembradas en placas de 96 pocillos. Los principales factores que afectan la velocidad de crecimiento celular en este tipo de placas son el número de células por  $\text{cm}^2$  y el porcentaje de SFB suplementado al medio de cultivo.

De acuerdo a las recomendaciones de Borenfreund (1985) para esta técnica, se buscaron las condiciones de sembrado para alcanzar un 60-70 % de confluencia celular a las 24 h de cultivo, y un tiempo total de 48 h hasta la medición de viabilidad.

De esta forma, las células fueron sembradas a densidades de 10.000, 20.000, 50.000 y 100.000 células/pocillo, en medio suplementado con 5 y 10 % de SFB. La determinación de confluencia se llevó a cabo mediante observación bajo microscopio, considerando además la morfología celular y la homogeneidad del sembrado. La observación se realizó a las 24 y 48 h posteriores a la siembra (**Tabla 2**).

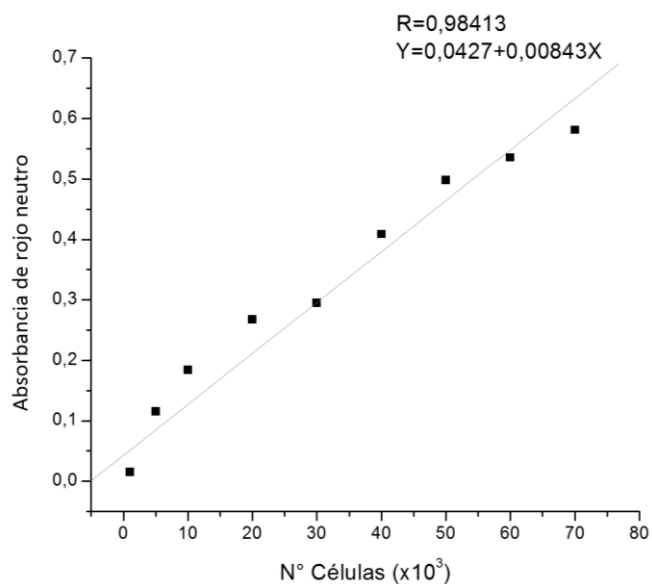
**Tabla 2. Porcentaje de Confluencia (% C) de células SH-SY5Y en placas de 96 pocillos según condiciones de sembrado.**

Células / Pocillo $\times 10^3$	5% SFB 24 / 48 h (% C)	10% SFB 24 / 48 h (% C)
<b>10</b>	40/90	60/100+
<b>20</b>	<b>70/100</b>	100/100+
<b>50</b>	90/100+	100/100+
<b>100</b>	100/100+	100+

De acuerdo a estos resultados las condiciones de siembra se determinaron en 20.000 células/pocillo en medio suplementado con 5% de SFB.

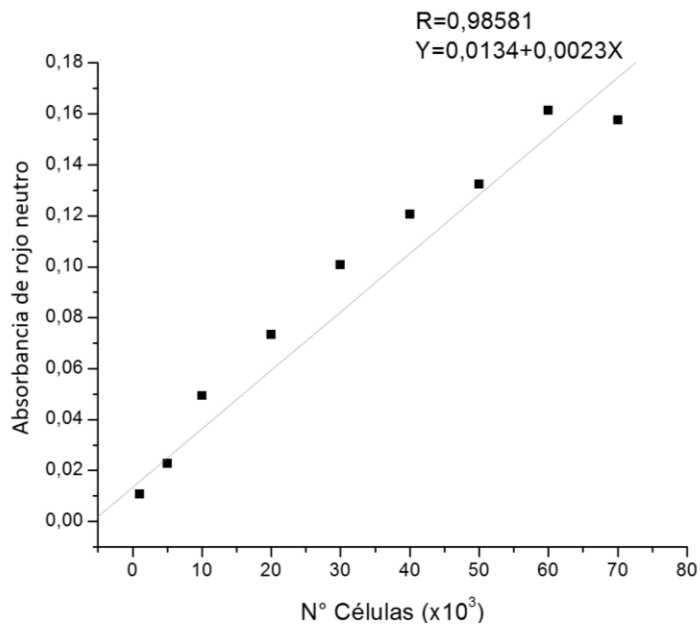
### 1.2.- Curva de calibración

Para la obtención de la curva de calibrado se siguió el protocolo descrito por Repetto (2008), obteniéndose una primera curva (**Fig. 9**).



**Figura 9. Curva de calibración con protocolo de Repetto y cols (2008).**

Para corroborar los valores de absorbancia, se realizó una segunda curva, bajo las mismas condiciones experimentales (Fig. 10).



**Figura 10. Curva de calibración para la técnica de rojo neutro según protocolo de Repetto y cols (2008).**

En este segundo experimento, los valores de absorbancia fueron notablemente inferiores respecto a la curva realizada con anterioridad.

Dado a que los resultados arrojaron una variación entre los valores de absorbancia en ambas placas sembradas a igual densidad, se realizó la búsqueda de los puntos críticos de la técnica en relación con la captación y liberación del colorante.

Tras el análisis del protocolo de Borenfreund y cols (1985) se modificó la preparación y concentración de las soluciones a utilizar, lo cual se detalla en la tabla 3.

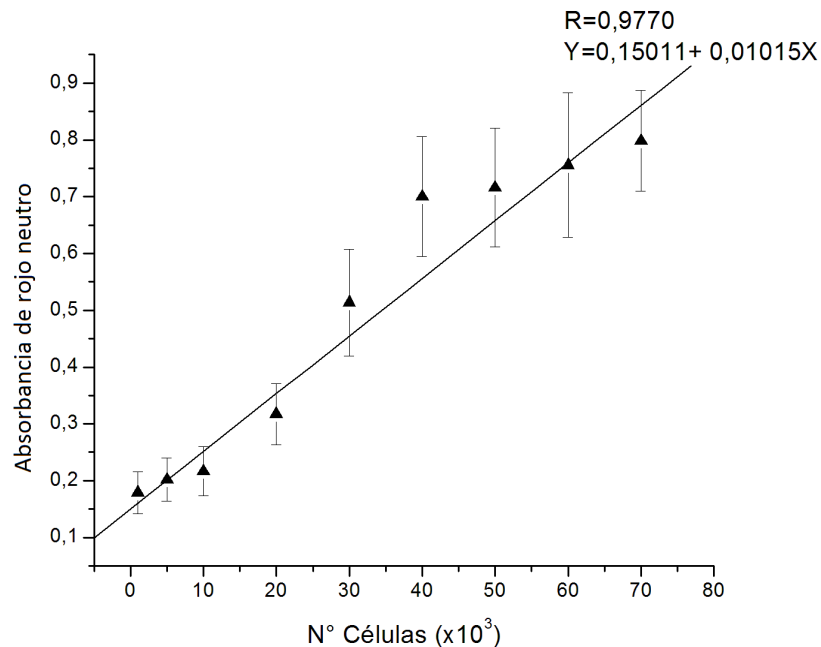
**Tabla 3. Comparación entre protocolos de la técnica de medición de viabilidad celular por captación de rojo neutro.**

<b>Repetto, 2008</b>	<b>Borenfreund, 1985</b>	<b>Ibaceta</b>
<b>Stock madre:</b> 40 mg de RN, disueltos en PBS. $C_f=4$ mg/mL	<b>Stock madre:</b> 40 mg de RN disueltos en PBS. Se agita en vórtex para homogenizar y luego se filtra con filtro de $0,22\mu\text{m}$ . $C_f=4$ mg/mL	Se siguen las indicaciones de Borenfreund.
<b>Solución de RN:</b> Dilución 1:1000 de Stock de RN en Medio de cultivo. $C_f= 40 \mu\text{g}/\text{mL}$ . Se mantiene en condiciones de cultivo ( $37^\circ\text{C}$ y atm. controlada), durante la noche previa al experimento.	<b>Solución de RN:</b> Dilución 1:80 de Stock de RN en Medio de cultivo. $C_f= 50 \mu\text{g}/\text{mL}$ . Se mantiene en condiciones de cultivo ( $37^\circ\text{C}$ y atm. controlada), durante 24 horas previas al experimento.	Se siguen las indicaciones de Borenfreund. El Medio de cultivo utilizado está estrictamente libre de SFB.
<b>Centrifugación de Solución de RN</b> por 10 min a 1500 rpm.	<b>Centrifugación de Solución de RN</b> por 20 min a 2000 rpm.	Se siguen las indicaciones de Borenfreund. Volumen Crítico de preparación $>20$ mL, preparado en tubo de centrifugación de 50 mL
<b>Volúmenes:</b> Por pocillo: $200\mu\text{L}$ de Solución de RN, $150\mu\text{L}$ de PBS y $150 \mu\text{L}$ de Solución de Extracción.	<b>Volúmenes:</b> Por pocillo: $200\mu\text{L}$ de Solución de RN, $200\mu\text{L}$ de PBS y $200\mu\text{L}$ de Solución de Extracción.	Se siguen las indicaciones de Borenfreund.
<b>Extracción de RN:</b> por 10 min en agitador de placas.	<b>Extracción de RN:</b> por 30 minutos.	<b>Extracción RN:</b> por 20 minutos en agitador de placas a 150 rpm.

El tiempo de incubación con solución de rojo neutro se estableció en 2,5 h, tal como se indica en ambos protocolos, mientras que la solución de elución no sufrió modificaciones en su formulación.

Luego de analizar cada modificación se procedió a realizar la curva de calibración de la técnica. Los valores de absorbancia obtenidos presentaron una mejora notable,

encontrándose un valor de  $R=0,9770$  para la absorbancia de rojo neutro en el rango de 0,1 a 0,8 UA. (**Figura 11**).



**Figura 11. Curva de Calibración de la técnica de captación de rojo neutro en la línea celular SH-SY5Y.** Valores de absorbancia obtenidos luego de 3 h de incubación con el colorante rojo neutro. Los experimentos fueron realizados por triplicado ( $n = 3$ ) en células provenientes de 3 pasajes diferentes. Los datos expresan  $M \pm S.E.$

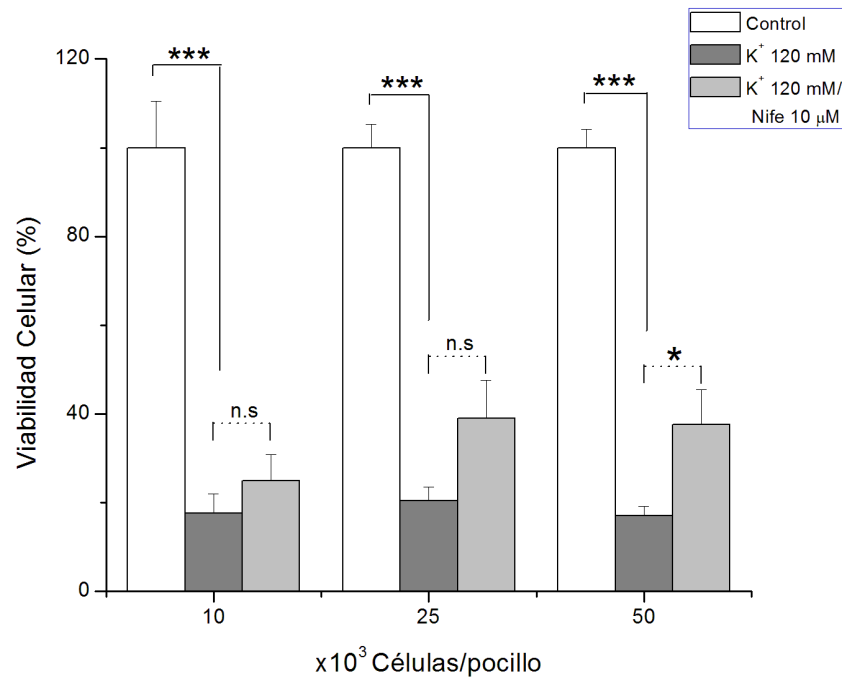
### 1.3 Controles de siembra

Adicionalmente se realizaron controles de siembra de las células SH-SY5Y, sembradas a  $2 \times 10^4$  células/pocillo. Se sembraron 4 placas bajo las mismas condiciones, en 4 pases diferentes, sin aplicar tratamiento. Transcurridas 48 h de incubación, se cuantificó la absorbancia mediante el test de captación de rojo neutro, con el propósito de determinar la homogeneidad de la siembra. El análisis de los datos con ANOVA arrojó como resultado que la población era estadísticamente homogénea, con un valor de  $p = 0,06831$ .

## 2.- Efecto de la despolarización continua con alto $K^+$ sobre la viabilidad de células SH-SY5Y.

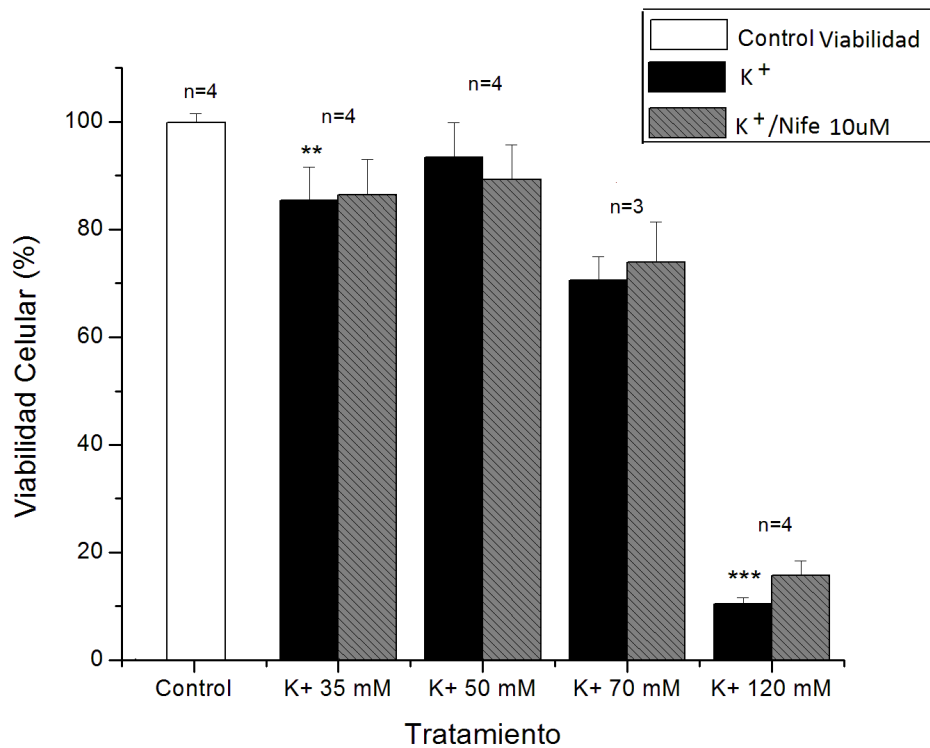
Para la determinación del efecto de la despolarización continua con  $K^+$  120 mM sobre la VC, se sembraron 3 densidades celulares en placas multipocillo (10, 25 y 50 mil células por pocillo). Los tres grupos de células fueron incubados por 24 h en Locke normal y a continuación 24 h más con los respectivos tratamientos. La medición con rojo neutro se realizó a las 48 h observándose que en los 3 grupos celulares el tratamiento con  $K^+$  120 mM produjo una disminución significativa de la VC, en relación a sus respectivos controles (100%), con valores VC de  $17,54 \pm 4,43 \%$  ( $p = 1,9 \times 10^{-8}$ );  $20,48 \pm 3,03 \%$  ( $p = 9,3 \times 10^{-15}$ ) y  $17,03 \pm 2,09 \%$  ( $p = 9,12 \times 10^{-19}$ ) para las densidades de 10 mil, 25 mil y 50 mil células, respectivamente.

Por su parte, en estos mismos experimentos, el efecto de  $K^+$  120 mM, en presencia del bloqueador de canales de  $Ca^{+2}$  (CCDV-L) nifedipino (10  $\mu$ M), varió entre un grupo y otro. Tanto para 10 y 25 mil células el aumento de la VC respecto del control de muerte, no fue significativo ( $24,93 \pm 5,88 \%$ ,  $p = 0,32$ ;  $39,01 \pm 8,64 \%$ ,  $p = 0,05082$ , respectivamente). No obstante, para 50 mil células por pocillo el efecto de protección fue significativo respecto al control de muerte, con un valor de VC de  $37,62 \pm 7,81 \%$  ( $p = 0,01556$ ,  $n=3$ ) (**Fig. 12**).



**Figura 12. Efecto de K<sup>+</sup> (120 mM, 24 h) en Locke sobre la viabilidad de células SH-SY5Y a distintas densidades de siembra.** K<sup>+</sup> indujo una disminución de la viabilidad celular (VC) en los 3 grupos celulares, en relación a sus respectivos controles de viabilidad. La incubación con K<sup>+</sup> en presencia de nifedipino, antagonista de los canales de Ca<sup>+2</sup>, indujo un aumento significativo de VC solamente en el grupo de siembra de 50 mil células/pocillo (n=3). Los datos corresponden a M ± S.E., n.s.= no significativo, \**p*<0,05; \*\*\**p*<0,001. Análisis estadístico con prueba t-Student.

Dado que los resultados no fueron los esperados, se realizó una modificación en el protocolo. Esta vez se probaron distintas concentraciones de KCl (35, 50, 70 y 120 mM) disuelto directamente en medio de cultivo suplementado con 5% de SFB en ausencia y presencia de nifedipino (10 μM). K<sup>+</sup> fue aplicado en células a una densidad de 2 x 10<sup>4</sup> células por pocillo, 24 h después de la siembra (**Fig. 13**). El pH de cada solución es 7,42, mientras que la osmolaridad (mOsm) fue calculada teóricamente, en la base a la osmolaridad indicada por el proveedor del medio de cultivo DMEM (260-320 mOsm), siendo de 330-390 mOsm para K<sup>+</sup> 35 mM, 360- 420 mOsm para K<sup>+</sup> 50 mM, 400-460 mOsm para K<sup>+</sup> 70 mM y 500- 560 mOsm para K<sup>+</sup> 120 mM.



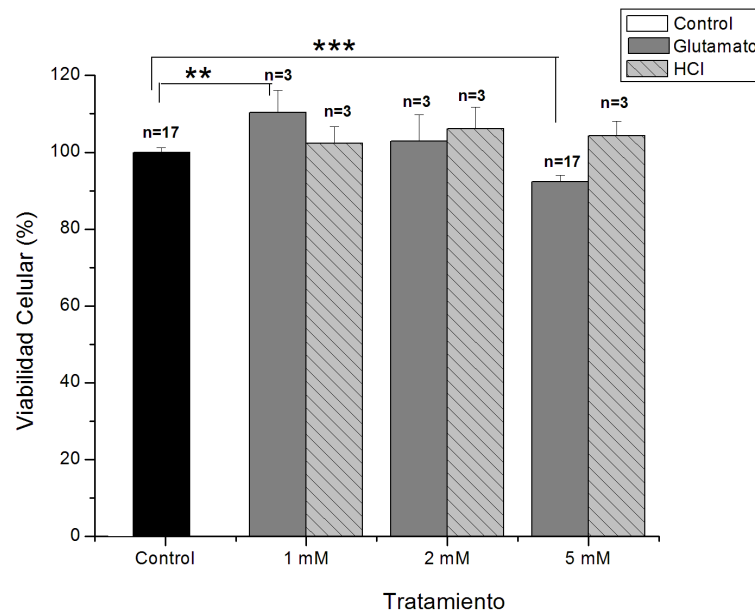
**Figura 13. Efecto de K<sup>+</sup> disuelto en Medio de Cultivo sobre la viabilidad de células SH-SY5Y.** Se muestra el efecto de 4 concentraciones de KCl, 35, 50, 70 y 120 mM (24 h) sobre células sembradas a una densidad de  $2 \times 10^4$  observándose una disminución significativa de la viabilidad celular (VC) sólo a 35 y 120 mM, respecto del control. Nifedipino, preincubado durante 30 min previo a la incubación con K<sup>+</sup>, no aumenta la VC en ninguno de los casos, respecto a su control de muerte con K<sup>+</sup>. Los datos corresponden a  $M \pm SE$ . \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  significativo respecto del control de VC. Análisis estadístico con prueba *t*-Student.

A 35 y 120 mM se observó una disminución significativa de la VC respecto del control de viabilidad ( $100 \pm 1,67\%$ ), mientras que a 50 y 70 mM de K<sup>+</sup> no se observó diferencias. A 35 mM la VC fue de  $85,36 \pm 6,19 \%$  ( $p = 0,00425$ ) y para 120 mM  $10,40 \pm 1,13 \%$  ( $p = 9,99E-47$ ). Por otra parte, no se observó protección de nifedipino 10  $\mu$ M a ninguna concentración.

Los siguientes experimentos tuvieron por objetivo determinar el efecto de IONO y GLU como inductores de muerte celular, así como el efecto de *t*-RV y *p*-CA como protectores.

### 3.- Efecto del tratamiento con Glutamato (GLU) sobre la viabilidad de células SH-SY5Y.

Se evaluó el efecto de GLU (1, 2 y 5 mM) sobre la VC. Luego de 24 h de la siembra, se aplicó el tratamiento con GLU por otras 24 h. Si bien el objetivo fue inducir muerte celular, GLU 1 mM aumentó significativamente la VC respecto del control ( $100 \pm 1,17 \%$ ), llegando a un  $110,36 \pm 5,81 \%$  ( $p = 0,00585$ ). Para GLU 2 mM el porcentaje de VC fue de un  $102,92 \pm 6,87 \%$ , siendo este efecto no significativo respecto al control. Finalmente GLU 5 mM (pH 6,90), disminuyó la VC significativamente respecto al control de viabilidad con un porcentaje de  $92,32 \pm 1,76 \%$  ( $p = 2,85E-04$ ). Además se realizó un control de solvente, con HCl sin GLU, adicionado directamente en medio de cultivo, en el mismo porcentaje utilizado a cada concentración de GLU (pH 6,90, con volumen agregado de HCl para GLU 5 mM). Para las 3 concentraciones utilizadas, HCl no indujo muerte celular significativa, con porcentajes de VC de  $102,35 \pm 4,29\%$  para 1mM ( $p = 0,48182$ );  $106,10 \pm 5,72\%$  para 2mM ( $p = 0,09868$ ) y  $104,22 \pm 3,90\%$  para 5mM ( $p = 0,19588$ ) (**Fig. 14**). La osmolaridad de cada solución no fue calculada ya que HCl no actúa como osmolito y el volumen adicionado es pequeño (1%), por lo que no altera la osmolaridad del medio. En el caso de glutamato, a pesar de ser una sal sódica, tampoco afecta la osmolaridad, dado a la concentración utilizada y al pequeño volumen agregado (1%).



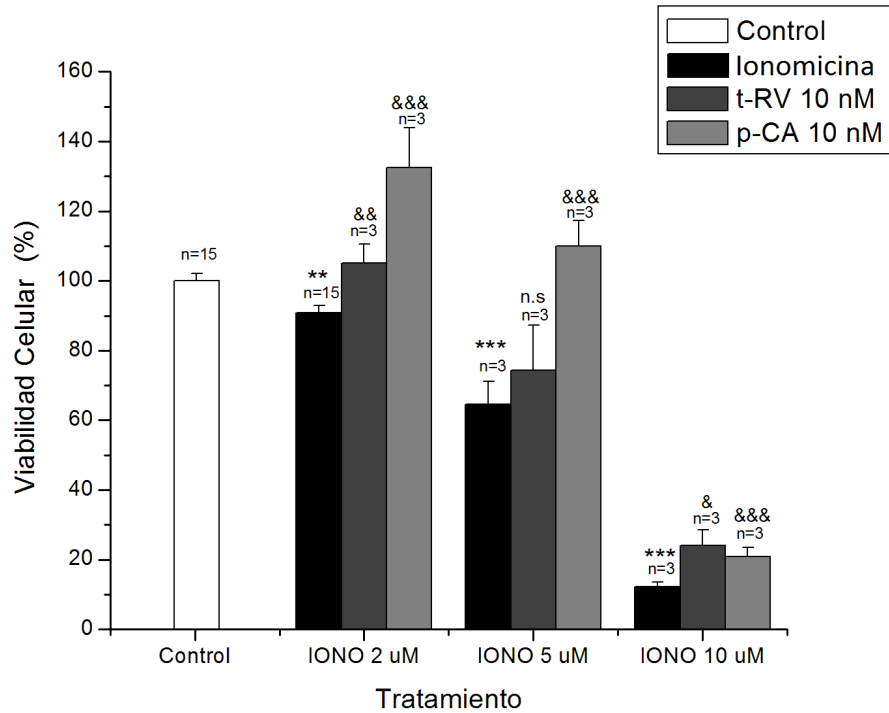
**Figura 14. Efecto de Glutamato sobre la viabilidad de células SH-SY5Y.** Glutamato (GLU) 1, 2 y 5 mM fue incubado durante 24 h, luego de 24 h de la siembra, a una densidad de  $20 \times 10^4$  células/pocillo. El solvente de GLU, HCl, no afecta la VC en ninguno de los 3 casos. Los datos corresponden a  $M \pm S.E.$  \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . Análisis estadístico con prueba de *t*-Student.

#### 4.- Efecto del tratamiento con Ionomicina sobre la viabilidad de células SH-SY5Y.

Se evaluó el efecto de 3 concentraciones de ionomicina (IONO) (2, 5 y 10  $\mu\text{M}$ ) sobre la VC, el cual fue aplicado al cultivo luego de 24 h de sembradas y durante 3 h de tratamiento. Las 3 concentraciones de IONO mostraron una reducción de la VC significativa respecto al control de viabilidad ( $100 \pm 2,14 \%$ ). Para IONO 2  $\mu\text{M}$  la VC fue un  $90,94 \pm 1,90 \%$  ( $p = 0,00184$ ), para 5  $\mu\text{M}$  fue un  $64,64 \pm 6,53 \%$  ( $p = 4,25\text{E-}10$ ) y para 10  $\mu\text{M}$  fue un  $12,24 \pm 1,21 \%$  ( $p = 1,5\text{E-}38$ ).

Como estudio preliminar, se evaluó el efecto de *t*-RV y *p*-CA  $10^{-8}$  M a las concentraciones establecidas de IONO. Respecto de IONO 2  $\mu\text{M}$ , tanto *t*-RV como *p*-CA aumentaron la VC, siendo de  $105,09 \pm 5,53 \%$  ( $p = 0,00995$ ) y  $132,45 \pm 11,40 \%$  ( $p = 3,04\text{E-}8$ ), respectivamente. Para el caso de IONO 5  $\mu\text{M}$ , *t*-RV no aumentó la VC ( $74,44 \pm 12,90 \%$ ,  $p = 0,50269$ ), mientras que para *p*-CA sí lo hizo con una VC de  $110,04 \pm 7,23 \%$  ( $p = 5,2\text{E-}5$ ).

Finalmente, con IONO 10  $\mu\text{M}$ , ambos compuestos aumentaron la VC, con valores de  $24,10 \pm 4,45 \%$  ( $p = 0,01468$ ) y  $20,78 \pm 2,63 \%$  ( $p = 5,69\text{E-}3$ ) para *t*-RV y *p*-CA, respectivamente (**Fig. 15**). IONO fue disuelto en DMSO, sin embargo, no se realizó control de solvente debido a que el porcentaje de este en el medio de cultivo es menor a la concentración tóxica (0,08%, IONO 2  $\mu\text{M}$ ). (Galvao, 2013)



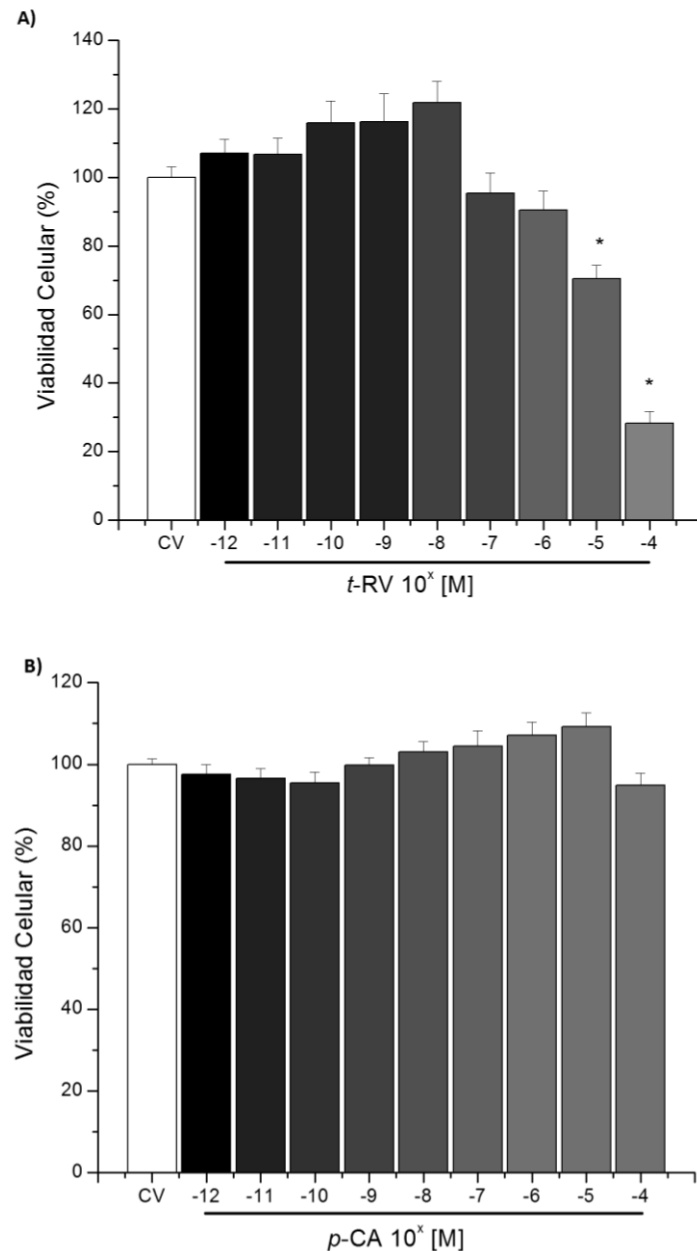
**Figura 15. Efecto de Ionomicina sobre la viabilidad celular de células SH-SY5Y.** IONO 2, 5 y 10  $\mu\text{M}$  fue incubada durante 3 h, tras 24 h de la siembra a una densidad de  $20 \times 10^4$  células/pocillo. La viabilidad celular (VC) fue determinada mediante la técnica de rojo neutro. Las tres concentraciones evaluadas disminuyeron la VC significativamente respecto al control de viabilidad. Por otra parte, *t*-RV y *p*-CA  $10^{-8}$  M, aplicados junto al insulto de muerte, aumentaron la VC, a excepción de *t*-RV 10  $\eta\text{M}$  con IONO 5  $\mu\text{M}$ , en el cual el aumento no fue significativo. Los datos corresponden a  $M \pm \text{S.E.}$  \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  significativo respecto de VC. & $p < 0,05$ ; && $p < 0,01$ ; &&& $p < 0,001$  significativo respecto de control de muerte (IONO). Análisis estadístico con prueba de *t*-Student.

### 5. Efecto de *trans*-Resveratrol y ácido *p*-Cumárico sobre la viabilidad celular.

Con el objeto de conocer si *t*-RV y *p*-CA poseen efectos intrínsecos sobre la VC se estudió su acción previa a la evaluación del potencial efecto neuroprotector. Para ello, las células SH-SY5Y sembradas en placas de 96 pocillos ( $2 \times 10^4$ /pocillo) fueron expuestas durante 48 h a concentraciones entre  $10^{-12}$  y  $10^{-4}$  M de *t*-RV o de *p*-CA, a 37 °C con atmósfera controlada al 5% de presión de CO<sub>2</sub>.

Los resultados obtenidos para *t*-RV, muestran que a concentraciones de  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  M la VC disminuye respecto a su control de viabilidad ( $100 \% \pm 3,18$ ), dando como resultado una VC de  $28,23 \pm 3,41 \%$  para  $10^{-4}$  M ( $p = 3,7 \times 10^{-24}$ ) y  $70,45 \pm 3,81 \%$  para  $10^{-5}$  M ( $p = 1,27 \times 10^{-7}$ ), mientras que el aumento de VC a  $10^{-8}$  M y  $10^{-10}$  M, no mostró diferencias significativas (**Fig. 16A**). Por su parte, los resultados con *p*-CA muestran que no existe citotoxicidad con de las concentraciones utilizadas, pero sí un aumento de viabilidad a concentraciones  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  M respecto al control de viabilidad, sin llegar a ser estadísticamente significativas (**Fig. 16B**).

Tanto *t*-RV como *p*-CA fueron disueltos en etanol absoluto, sin embargo, no se realizó el control de vehículo dado que el porcentaje utilizado (1%) es inocuo para el cultivo celular. (Tapani, 1996)



**Figura 16. Viabilidad de células SH-SY5Y incubadas por 48h a distintas concentraciones de A) t-RV o B) p-CA.** Las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos a una densidad de 20 mil células/pocillo e incubadas durante dos días con A) t-RV o B) p-CA. A las 48 h la viabilidad celular fue determinada mediante el ensayo de captación de rojo neutro. A) Los resultados para t-RV muestran que existen efectos citotóxicos a altas concentraciones ( $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  M), los cuales son altamente significativos respecto a su control de viabilidad. p-CA indujo un aumento de VC para dos concentraciones  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  M (n.s.) mientras que las concentraciones restantes no muestran efectos tóxicos ni proliferativos. Los datos corresponden a  $M \pm S.E.$   $n = 6$  para t-RV y  $n = 4$  para p-CA. \* $p < 0,05$ , ANOVA una vía. Test de Tukey.

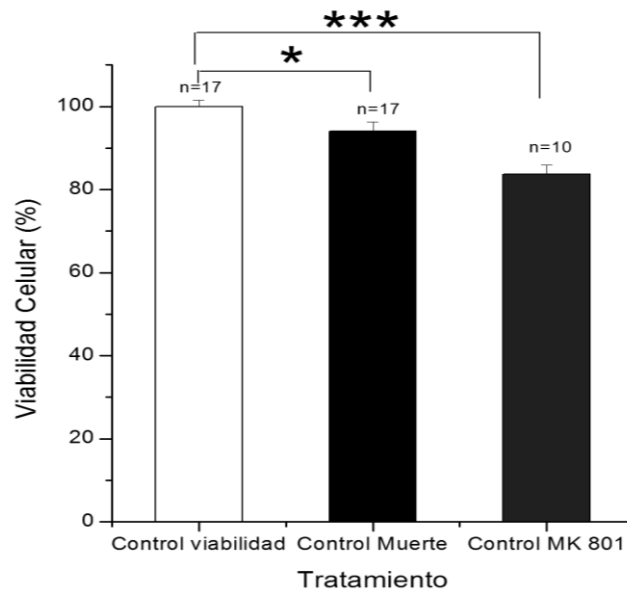
## **6.- Efecto del tratamiento Continuo con *t*-RV o *p*-CA sobre la viabilidad de células SH-SY5Y frente a muerte inducida por glutamato o ionomicina.**

Una vez estandarizados los modelos de muerte con GLU (5 mM) o IONO (2  $\mu$ M), y conociendo el efecto control de los compuestos estudiados, el siguiente objetivo experimental fue evaluar el posible efecto protector de *t*-RV y *p*-CA en un rango amplio de concentraciones, frente a los insultos de muerte. Para ello se siguió el diseño descrito en metodología. En el caso del tratamiento continuo el compuesto de estudio, *t*-RV o *p*-CA, fue adicionado a las células en medio de cultivo luego de una hora, posterior al sembrado, por un tiempo 24 h. Transcurrido este tiempo, las células fueron expuestas al compuesto de estudio en medio de cultivo que adicionalmente contenía el insulto de muerte. Para el caso de GLU la incubación fue de 24 h y para IONO de 3 h.

### **6.1 Efecto protector de *t*-RV y *p*-CA en tratamiento Continuo frente a muerte inducida por glutamato.**

El control de muerte con GLU 5mM indujo una disminución de la VC respecto al control de viabilidad ( $100 \pm 1,58\%$ ;  $n=17$ ), con un porcentaje del  $92,32 \pm 1,76\%$  de VC ( $p= 2,85 \times 10^{-4}$ ;  $n=17$ ). El control de bloqueo (MK-801, 10  $\mu$ M), arrojó una disminución de la VC, contrariamente a lo esperado, siendo menor incluso que el control de muerte, con una VC de  $83,71 \pm 2,18 \%$  ( $p = 8,52 \times 10^{-8}$ ;  $n=10$ ) (**Fig. 17**). Este control de muerte fue utilizado para los tratamientos continuo y conjunto, dado que GLU fue aplicado en ambos casos, al segundo día del experimento.

MK-801 fue disuelto en DMSO para el cual no se realizó control de solvente dado a que el porcentaje utilizado (0,1%) es inocuo para el cultivo celular (Galvao, 2013).



**Figura 17. Efecto de Glutamato 5mM sobre la viabilidad de células SH-SY5Y.** Las células fueron incubadas con Glutamato (GLU) durante 24 h, el segundo día de cultivo. Las células fueron sembradas a una densidad de  $20 \times 10^4$  células/pocillo y la viabilidad celular se determinó a las 48 h con la técnica de rojo neutro. A una concentración de 5mM de GLU disminuye la VC significativamente respecto al control de viabilidad. GLU fue aplicado en presencia del antagonista de receptores de NMDA, MK801 ( $10 \mu\text{M}$ ) (primera columna de la derecha) lo cual también disminuyó la VC, indicando que los receptores de NMDA no estarían implicados en el mecanismo de muerte inducida por este compuesto. Los datos corresponden a  $M \pm \text{S.E.}$ , \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . Análisis estadístico con prueba de *t*-Student.

Respecto a los compuestos de estudio, se realizaron curvas concentración-respuesta ( $10^{-12}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  M) por 24 h y las 24 h siguientes en presencia de GLU 5 mM. Los resultados obtenidos se muestran en la **fig. 18**, tanto para *t*-RV como para *p*-CA, comparados con el control de muerte. Las concentraciones más altas de *t*-RV  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  M ejercieron un efecto citotóxico, disminuyendo los porcentajes de VC a  $19,18 \pm 3,04$  % y  $69,21 \pm 2,87$  %, respectivamente, mientras que aumentó la VC a concentraciones más bajas, con un  $109,43 \pm 6,67$  % a  $10^{-10}$  M. Los datos para todas las concentraciones de ambos compuestos se encuentran en la **tabla 4**.

Los datos fueron analizados mediante *t*-de Student (cada concentración respecto del control). Sin embargo, dado que esta forma de análisis podría acumular algún grado de

error al realizarse de forma seriada, se realizó un segundo análisis con ANOVA y prueba post-hoc de Tukey.

**Tabla 4. Análisis estadístico de los resultados de viabilidad de células SH-SY5Y tratadas con t-RV o p-CA en tratamiento Continuo frente a glutamato como insulto de muerte.**

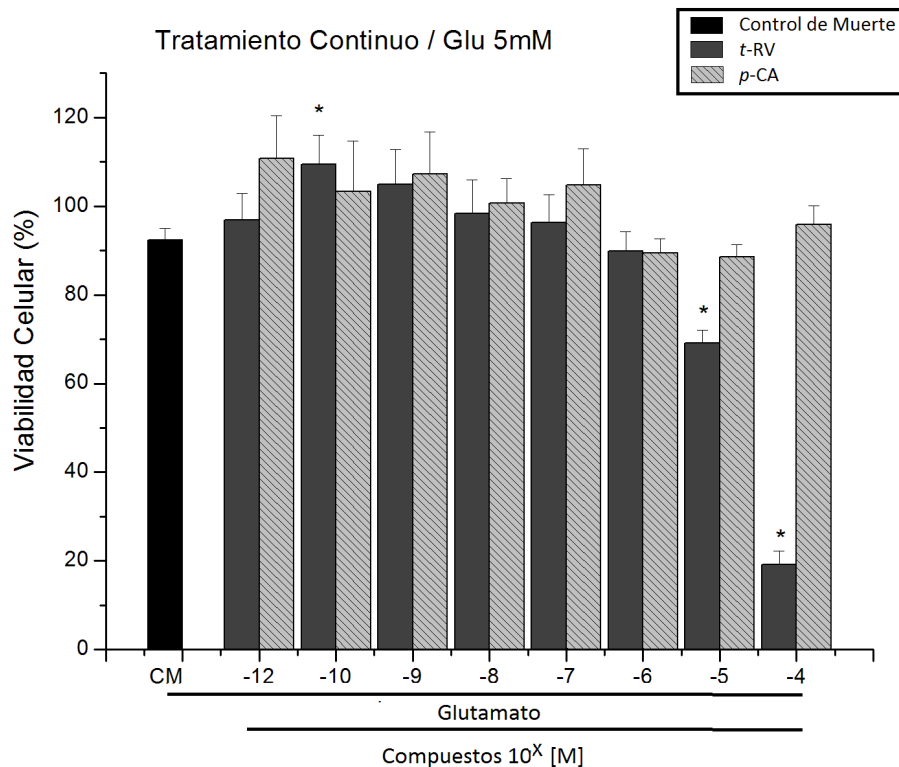
Compuesto	t-RV			p-CA		
Concentración (M)	VC (%)	p Value		VC (%)	p Value	
$10^{-4}$	19,18 ± 3,04	4,29E-33	***&	95,82 ± 4,31	0,41456	n.s
$10^{-5}$	69,21 ± 2,87	9,23E-08	***&	88,64 ± 2,73	0,35796	n.s
$10^{-6}$	89,84 ± 4,47	0,56652	n.s	89,4 ± 3,24	0,47402	n.s
$10^{-7}$	96,28 ± 6,38	0,41026	n.s	104,73 ± 8,20	0,02214	*
$10^{-8}$	98,39 ± 7,63	0,2424	n.s	100,66 ± 5,54	0,07025	n.s
$10^{-9}$	104,90 ± 7,96	0,01879	**	107,34 ± 9,42	0,01041	*
$10^{-10}$	109,43 ± 6,67	6,71E-04	***&	103,34 ± 11,31	0,08974	n.s
$10^{-12}$	96,89 ± 6,01	0,33117	n.s	110,85 ± 9,51	0,00182	**

Los datos representan M ± S.E. (%)

\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ , t-Student respecto a control de muerte.

& $p < 0,05$ , ANOVA una vía, test de Tukey.

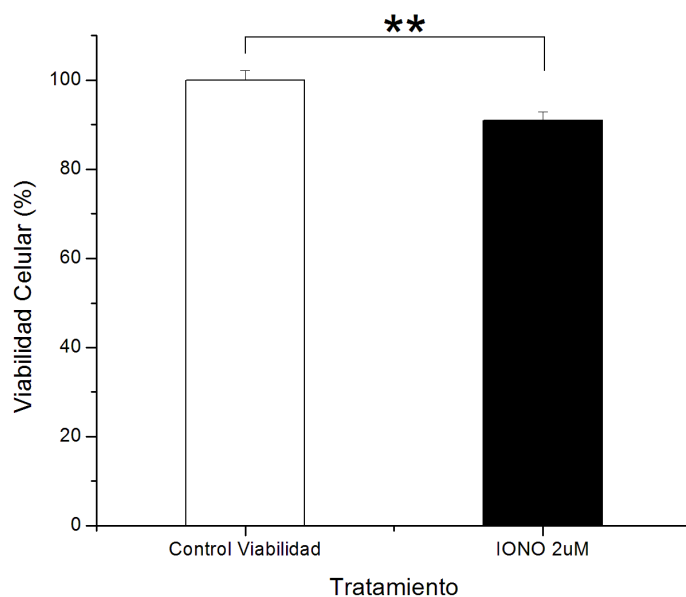
Tanto en estos datos como en los siguientes se consideraron los resultados arrojados por análisis ANOVA.



**Figura 18. Viabilidad de células SH-SY5Y en tratamiento Continuo con *t*-RV o *p*-CA frente a muerte inducida por glutamato 5mM.** Comparación de las distintas concentraciones de cada compuesto con el control de muerte. Para control de muerte (CM) n=17, para cada compuesto n=3. Los datos corresponden a M ± S.E. \* $p < 0,05$ ; ANOVA, test de Tukey.

## 6.2 Efecto protector de *t*-RV y *p*-CA en tratamiento continuo frente a muerte inducida por ionomicina.

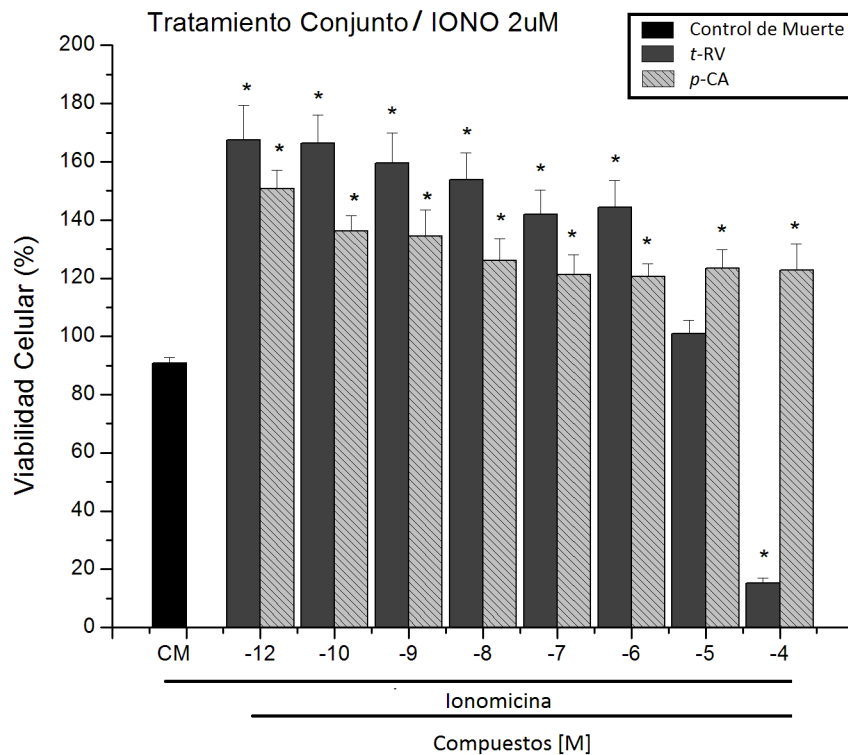
El control de muerte con IONO 2 $\mu$ M, produjo una disminución de la VC respecto al control de viabilidad (100 ± 2,14 %, n=15), del 90,94 ± 1,90 % ( $p = 0,00184$ , n=15) (**Fig. 19**). Este control de muerte fue el utilizado para el tratamiento continuo y conjunto, dado que IONO fue aplicado en ambos casos, al segundo día del experimento.



**Figura 19. Efecto de IONO 2µM sobre la VC de células SH-SY5Y.** Ionomicina fue aplicado durante 3 h sobre las células al segundo día de cultivo. Se observa una disminución significativa de la VC, respecto al control de viabilidad. Los datos corresponden a  $M \pm S.E.$ ,  $**p < 0,01$ . Análisis estadístico con prueba *t*-Student.

Los resultados obtenidos con *t*-RV y *p*-CA frente a la muerte inducida por ionomicina 2 µM se muestran en la **fig. 20**. A la concentración más alta de *t*-RV ( $10^{-4}$  M), se produjo una reducción significativa de la VC respecto al control de muerte, con un valor del  $15,18 \pm 1,78$  %, mientras que a  $10^{-5}$  M se observó un aumento de VC no significativo.

A las concentraciones más bajas del compuesto mayor fue el aumento de viabilidad. Respecto al compuesto *p*-CA, el aumento de la VC es altamente significativo a todas las concentraciones respecto al control de muerte. Los resultados se muestran en la **Fig. 20**.



**Figura 20. Viabilidad de células SH-SY5Y en tratamiento continuo con *t*-RV o *p*-CA frente a muerte inducida por ionomicina 2  $\mu$ M.** Comparación de las distintas concentraciones de cada compuesto con el control de muerte. Para CM n=15, para cada compuesto n=3. Los datos corresponden a  $M \pm S.E.$ , \* $p < 0,05$ . Análisis estadístico con ANOVA, test de Tukey.

### **7.- Efecto de *t*-RV o *p*-CA en tratamiento conjunto sobre la viabilidad de células SH-SY5Y frente a muerte inducida por glutamato o ionomicina**

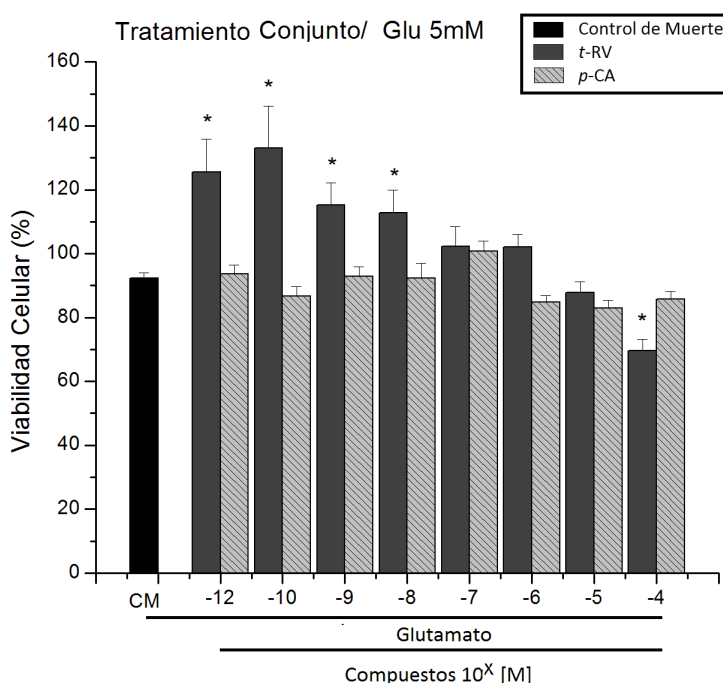
El tratamiento conjunto hace referencia a la adición del compuesto en estudio, *t*-RV o *p*-CA junto a GLU a las 24 h de cultivo e incubadas por 24 h o junto a IONO e incubadas durante 3 horas.

#### **7.1 Efecto protector de *t*-RV o *p*-CA en tratamiento conjunto frente a muerte inducida por glutamato.**

Para el análisis de los resultados obtenidos con los compuestos de estudio en este tratamiento, se utilizaron los datos de control de viabilidad, control de muerte y control

de bloqueo (MK-801) presentados en la **Figura 17**. Para *t*-RV a la concentración de  $10^{-4}$  M, como se ha observado anteriormente, se produjo una disminución de la VC, respecto al control de muerte, con un porcentaje de VC del  $69,55 \pm 3,64$  %. A concentraciones de  $10^{-12}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$  M, es posible observar un aumento altamente significativo de la VC con porcentajes de  $112,71 \pm 7,25$  %,  $115,32 \pm 6,86$  %,  $133,06 \pm 13,14$  % y  $125,61 \pm 10,20$  %, para cada concentración respectivamente.

En el caso de *p*-CA, no se observó aumento un significativo de la VC a ninguna concentración, sin embargo, a las concentraciones más altas ( $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-4}$  M), se apreció una tendencia a menores valores de VC respecto al control de muerte aunque no significativa (**Fig. 21**).

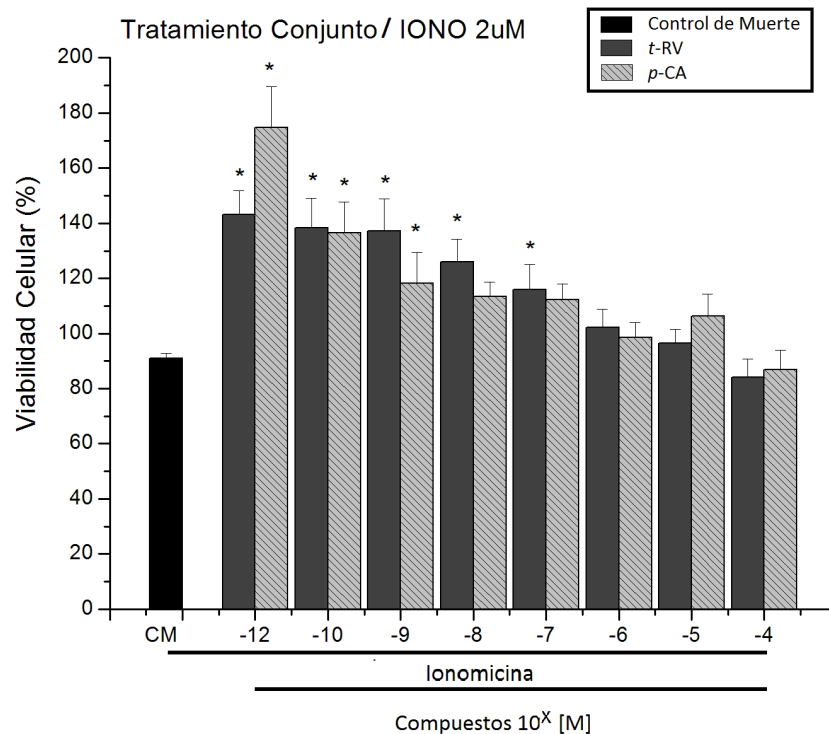


**Figura 21. Viabilidad de células SH-SY5Y en tratamiento conjunto con *t*-RV o *p*-CA frente a muerte inducida por glutamato 5 mM.** Comparación de las distintas concentraciones de cada compuesto con el control de muerte. Para CM n=17, para cada compuesto n=3. Los datos corresponden a  $M \pm S.E.$  \* $p < 0,05$ . Análisis estadístico con ANOVA, test de Tukey.

## 7.2 Efecto protector de *t*-RV o *p*-CA en tratamiento Conjunto frente a muerte inducida por ionomicina.

Al igual que para glutamato, los datos de muerte inducida por IONO fueron los mismos que se utilizaron para el tratamiento continuo (Fig. 19).

Respecto a lo obtenido con los compuestos de estudio, la VC aumentó de manera significativa a bajas concentraciones de ambos compuestos ( $10^{-12}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$  M para *t*-RV y  $10^{-12}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$  M para *p*-CA) (Fig. 22).

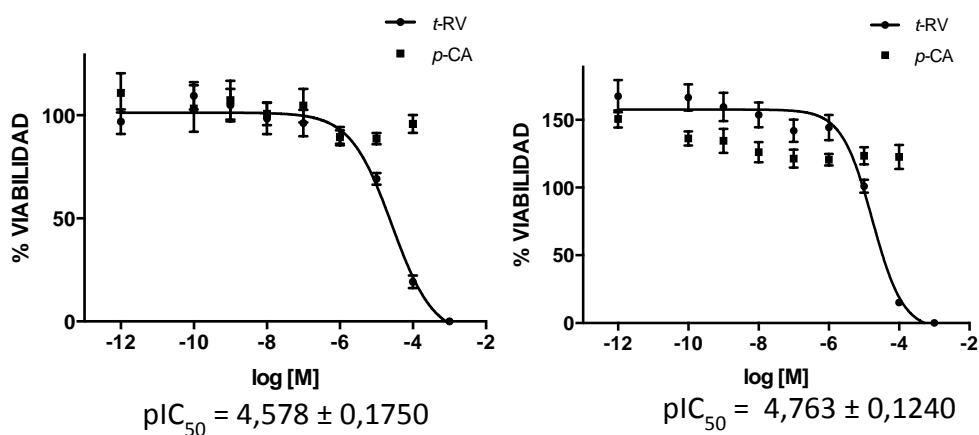


**Figura 22. Viabilidad de células SH-SY5Y en tratamiento conjunto con *t*-RV o *p*-CA frente a muerte inducida por ionomicina 2µM.** Comparación de las distintas concentraciones de cada compuesto con el control de muerte. Para CM n=15, para cada compuesto n=3. Los datos corresponden a M ± S.E. \* $p < 0,05$ . Análisis estadístico con ANOVA, test de Tukey.

Además, a concentraciones altas ( $10^{-4}$  M) hay una disminución de la VC en ambos compuestos pero no de manera significativa respecto al control de muerte.

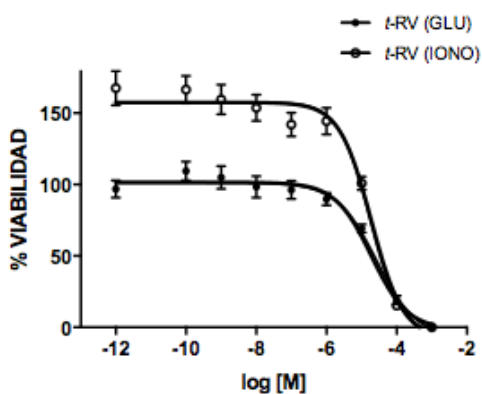
### Curvas concentración-respuesta

De acuerdo a los resultados obtenidos, se realizó el análisis de la relación concentración versus respuesta para el tratamiento continuo con *t*-RV en presencia de GLU e IONO, esto en base a que sólo en estos experimentos se observaron efectos mínimos y máximos sobre la VC. De las gráficas obtenidas (**Fig. 23**) se obtuvieron los valores de  $pIC_{50}$  para el efecto de muerte inducido por *t*-RV, los cuales fueron  $4,578 \pm 0,1750$  para el tratamiento en presencia de GLU y  $4,763 \pm 0,1240$  para el tratamiento en presencia de IONO.



**Figura 23.** Curvas concentración-respuesta del efecto de *t*-RV y *p*-CA sobre la VC de células SH-SY5Y. Los datos corresponden a la VC de tratamiento continuo en presencia de GLU o IONO.

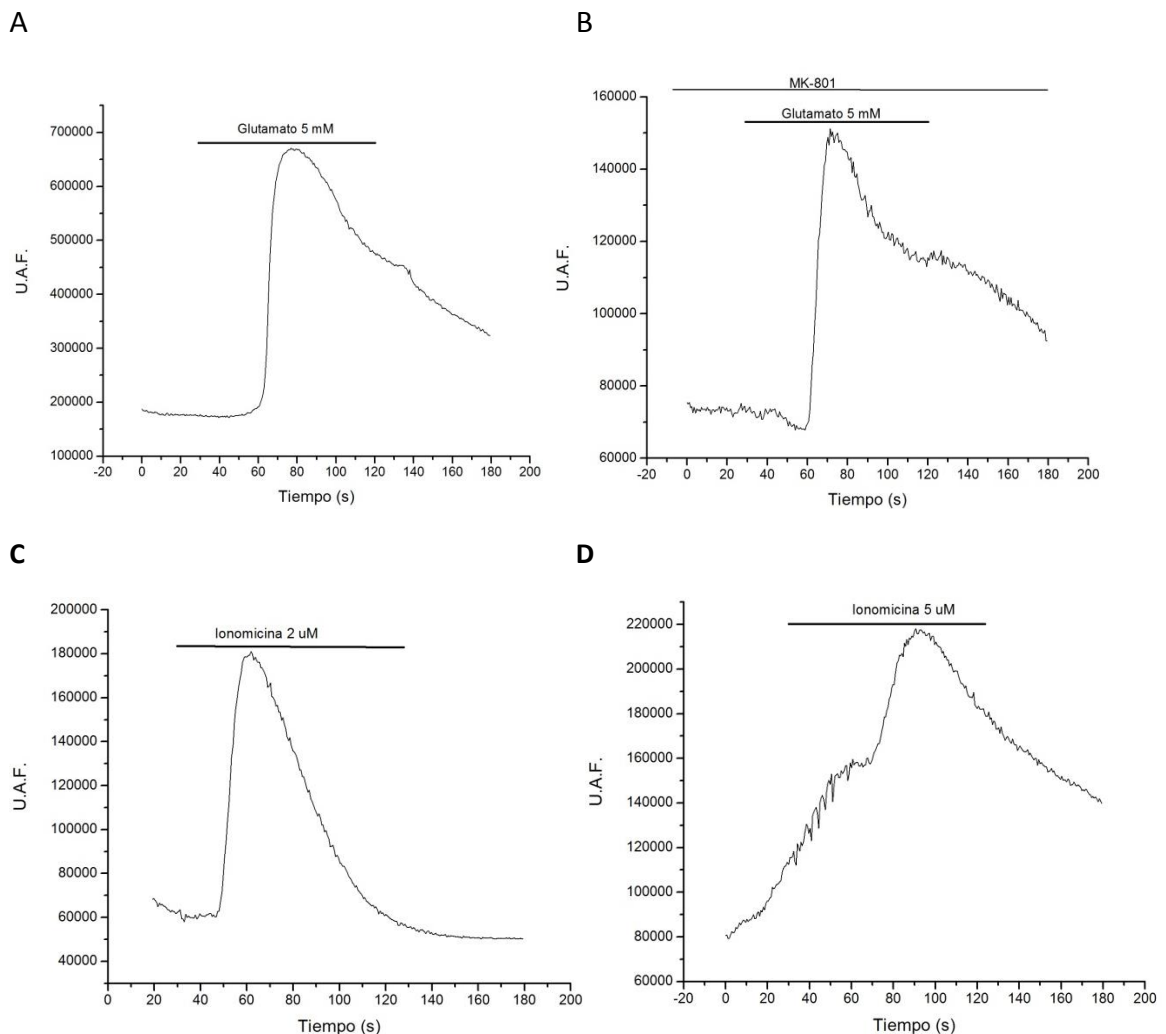
El análisis comparativo muestra que no existen diferencias significativas entre los valores de  $pIC_{50}$ , sugiriendo que el efecto de muerte fue debido a la acción de *t*-RV (**Fig. 24**).



**Figura 24.** Curva concentración-respuesta comparativa.

## 8.- Efecto de Glutamato e Ionomicina sobre el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ en células SH-SY5Y.

Para evaluar el efecto de GLU y IONO sobre la  $[Ca^{2+}]_i$ , se realizaron experimentos con el fluoroforo específico de  $Ca^{2+}$ , Fluo-3 AM. Ambos compuestos, aplicados de forma aguda (1 min), fueron capaces de inducir un aumento de la señal citosólica de  $Ca^{2+}$ , la cual fue revertida tras el lavado (**Figs. 25**).



**Figura 25. Registros originales de la señal citosólica de  $[Ca^{2+}]_i$  en células SH-SY5Y individuales cargadas con la sonda fluorescente de  $Ca^{2+}$  fluo-3 AM en respuesta a glutamato o ionomicina. En la figura A) se observa el incremento transitorio característico de la  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por la estimulación aguda con GLU 5 mM 8 (n=5). B) Elevación de la  $[Ca^{2+}]_i$  inducida por GLU 5 mM en células preincubadas (40 min) con el antagonista de receptores NDMA, MK801 (10  $\mu$ M) (n=4). La**

estimulación con ionomicina  $2\mu\text{M}$  C) y  $5\mu\text{M}$  indujo incremento del  $\text{Ca}^{+2}$  citosólico. Representativo de 5 experimentos individuales. U.A.F= unidades arbitrarias de fluorescencia.

## DISCUSIÓN

En el presente trabajo se estudió el efecto de dos polifenoles, *t*-RV y *p*-CA, sobre células de neuroblastoma humano SH-SY5Y sometidas a muerte inducida por  $\text{Ca}^{2+}$ , con la utilización de glutamato e ionomicina como noxas. Los resultados demuestran que, 1) tanto GLU (5 mM, 24 h) como IONO (2  $\mu\text{M}$ , 3 h) provocan la muerte de las células SH-SY5Y; 2) la estimulación aguda con GLU 5 mM e IONO 2 y 5  $\mu\text{M}$  induce un incremento de la señal citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$ , 3) la incubación con *t*-RV a  $10^{-10}$  M es capaz de proteger a las neuronas frente a la muerte inducida por GLU e IONO, en ambos tipos de tratamientos (Continuo y Conjunto); 4) *t*-RV a 10 y 100  $\mu\text{M}$  induce muerte celular 5) *p*-CA protege las células SH-SY5Y sometidas a muerte con IONO en ambos tipos de tratamientos, pero no frente a muerte inducida por GLU.

La puesta a punto de la técnica de captación de Rojo Neutro, implicó una exhaustiva revisión y adaptación de los protocolos publicados, debido a que al realizar las curvas de calibración, existieron notorias diferencias respecto a los valores de absorbancia siguiendo el protocolo de Repetto y cols. (2008). Se realizaron modificaciones a la técnica, siguiendo el protocolo de quienes fueron los pioneros en su utilización, Borenfreund y cols (1985).

La primera modificación realizada tuvo relación con la preparación del stock madre de Rojo Neutro. Éste fue disuelto en PBS y vorteadado por unos minutos para lograr su completa homogenización. Posteriormente, se pasó por un filtro de 0,22 micras para luego ser almacenado protegido de la luz. El procedimiento de filtrado no está descrito en el protocolo de Repetto y cols. (2008), y sí en el protocolo de Borenfreund y cols. (1985). Este paso permitió eliminar los restos insolubles de colorante, asegurando la homogeneidad y la concentración del Stock.

De acuerdo al protocolo de Borenfreund y cols. (1985) y Repetto y cols. (2008), la preparación de la solución de rojo neutro a partir del stock madre, se debe realizar 24 h (o una noche previa) a la tinción de células, sin embargo, varían en las concentraciones

recomendadas, ya que Repetto indica que la disolución debe ser 1:100 (stock: medio) y Borenfreund indica que esta debe ser 1:80, obteniéndose mejores resultados con esta última. Otro punto crítico dentro de la preparación de esta solución, es el volumen a preparar, ya que experimentalmente se observó que a volúmenes menores de 20 mL, el colorante precipitaba considerablemente al momento de la centrifugación previa a la tinción, mientras que a volúmenes superiores este fenómeno no ocurría. Al momento de precipitar, la cantidad de colorante disponible para las células disminuía notoriamente, obteniéndose absorbancias que no se correspondían correctamente al número de células. Por ende, se prepararon cada vez volúmenes superiores a 20 mL, mientras que el tiempo y velocidad de centrifugación también se aumentaron respecto al protocolo de Repetto a 2000 rpm por 20 min, con el fin de eliminar cualquier precipitado que pudiese afectar el resultado del ensayo. Finalmente, también se resolvió preparar esta solución sin suero fetal bovino, para que este no interfiriera al momento de la extracción del colorante con etanol ácido, aunque esto no está descrito en ningún protocolo, fue recomendado por el Dr. Manuel Romero (comunicación oral). Luego al momento de agregar la solución de rojo neutro, preparada como se indica con anterioridad, se procedió a lavar con PBS previamente cada pocillo tras retirar el medio con las moléculas de prueba, con la finalidad de evitar la precipitación del colorante por la interacción entre compuestos. Con todas estas modificaciones, los valores de absorbancia estuvieron en concordancia con los publicados y se correlacionaron con el número de células presentes en cada pocillo.

El ensayo de captación de rojo neutro posee amplias ventajas respecto a otros ensayos que permiten determinar citotoxicidad. Una de las principales es su bajo costo y bajo impacto medioambiental (Weyermann y cols., 2005). Además en comparación con ensayos como el MTT, es más sensible en cuanto a los valores de absorbancia, debido a la pobre solubilidad del producto formazan y también debido a que la cantidad de colorante retenido por los lisosomas en el caso de rojo neutro es mayor a la cantidad de sal de tetrazolio reducido por la mitocondria (Borenfreund y cols., 1988).

Ya que esta técnica puede inducir a obtener resultados erróneos por la precipitación del colorante, ya sea, por estabilidad en solución o por interacción con los compuestos de prueba, Repetto y cols. (2008), señalan que es necesario realizar un recuento total de proteínas presente en los pocillos de la placa y así descartar sobreestimación o subestimación de la VC. Dado que el tiempo experimental era limitado, la medición de proteínas no se llevó a cabo, sin embargo, se realizó un control de siembra que permitió, por una parte determinar la homogeneidad del sembrado y por otra parte, con los valores de absorbancias obtenidos y por exámen bajo microscopio, se comprobó que RN no estaba precipitando, obteniéndose lecturas homogéneas entre pocillos.

Respecto a la interacción con los compuestos de prueba, como se mencionó con anterioridad, y tal como lo recomienda Repetto y cols (2008), se agregó un paso de lavado con PBS luego de retirar el medio con tratamiento y previo a la adición de solución de RN.

El aumento de  $[Ca^{2+}]_i$ , y su consecuente desregulación homeostática, constituye una de las hipótesis más importantes que explican el proceso de neurodegeneración y muerte neuronal (Toescu y Vreugdenhil, 2010). El primer objetivo experimental fue reproducir los datos obtenidos por Cárdenas (2012), donde el aumento de  $[Ca^{2+}]_i$  fue inducido por despolarización con  $K^+$  y la apertura de CCDV-L, principal vía de entrada de este ión a nivel de membrana celular (Catterall, 2011), con el fin de inducir muerte celular. Además, se utilizó nifedipino 10  $\mu$ M, un conocido bloqueador de canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje (Flores, 1998), para proteger a las células de la entrada de  $Ca^{2+}$ .

Los resultados obtenidos por Cárdenas (2012), fueron obtenidos utilizando la técnica de exclusión de azul de tripán, con recuento celular bajo microscopio. Al adaptar el protocolo a las nuevas condiciones experimentales, la principal diferencia radicó en los resultados en presencia de nifedipino, el que fue capaz de ejercer efecto neuroprotector, solo frente a tratamiento con solución Locke alto  $K^+$  120 mM en células sembradas a una densidad de  $5 \times 10^4$  célula/pocillo. A densidades celulares menores, y con  $K^+$  en medio de cultivo, no se observó protección. Esto nos llevó a considerar por tanto que, en las nuevas condiciones

experimentales, la muerte celular no siempre se produjo por despolarización de la membrana inducida por  $K^+$  y la consecuente activación de CCDV-L. Algunos posibles factores que estarían implicados en esta diferencia podrían ser la osmolaridad de las soluciones utilizadas (Locke respecto del medio de cultivo) y la mayor sensibilidad del nuevo procedimiento, respecto del método por exclusión con azul de tripán. En cuanto a la osmolaridad, lo ideal era realizar su medición, sin embargo, no se contaba con los instrumentos necesarios para ello. En relación a los factores referidos a la línea celular empleada como modelo de estudio, se ha descrito la presencia de subpoblaciones en las células SH-SY5Y, las cuales presentan diferencias tanto en la expresión de receptores como en su funcionalidad; por ejemplo, frente a la estímulos despolarizantes como  $K^+$  (Kawamoto y cols., 2012). Por otra parte, es importante destacar que el uso de Locke también podría estar afectando la viabilidad celular induciendo apoptosis por falta de nutrientes. Esta situación difiere a la experimentada por Cárdenas, dado a que la relación n° de células/volumen es mayor, por lo que al tener menos células y más volumen las células podían soportar de mejor manera la falta de nutrientes, sin embargo, en este caso, al tener un mayor número de células y menor volumen, el gasto energético es mayor y la glucosa, única fuente de energía, es menor, situación que podría haber afectado los resultados, interfiriendo por ejemplo en la muerte celular y en la protección con nifedipino.

Dadas las dificultades en estandarizar un protocolo de muerte inducida por  $K^+$ , se decidió utilizar IONO, un ionóforo de  $Ca^{2+}$  que permite la entrada de este ión a través de poros en la membrana plasmática y GLU, un neurotransmisor conocido por inducir muerte neuronal por aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$ , fenómeno conocido como excitotoxicidad (Dong y cols., 2009).

El principal obstáculo a superar en el trabajo con GLU fue su disolución. Debido a que los proveedores de este reactivo recomiendan su disolución en HCl 1N, se ha puesto en duda si la muerte inducida por GLU se debe a la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de la activación de

receptores ionotrópicos, como el receptor NMDA, o por la acción del HCl y el cambio de pH que provoca en el medio de cultivo (Croce y cols., 2013). Sin embargo, de acuerdo al trabajo experimental, HCl a pesar de variar el pH (6,60), no indujo muerte a las concentraciones probadas. Las concentraciones utilizadas de GLU fueron 1, 2 y 5 mM, de acuerdo a lo observado por Croce y cols. (2013), con resultados similares a los obtenidos en este trabajo. Si bien Croce y cols. (2013), observan un aumento de VC con GLU 2 mM y muerte significativa con GLU 10 mM sobre la línea celular SH-SY5Y, estos resultados son comparables a los de esta tesis donde GLU 1 mM aumentó la VC y GLU 5 mM indujo muerte de manera significativa, vale decir, que la disminución de la VC es concentración dependiente.

Por otra parte, realizando la medición fluorimétrica de  $\text{Ca}^{2+}$  con Fluo-3 AM, se comprobó que GLU 5 mM incrementa la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en células SH-SY5Y. Sin embargo, los resultados obtenidos con GLU en conjunto con MK-801 (10  $\mu\text{M}$ ), un bloqueador de los receptores NMDA, permiten inferir que el mecanismo por el cual GLU indujo muerte celular no fue por la activación de estos receptores, ya que MK-801 no aumentó la VC, es más, la disminuyó. Esto también fue observado por Zhong-Wei y cols. (2010), aunque las concentraciones de GLU y MK-801 utilizadas difieren a las de este trabajo, MK-801 (5  $\mu\text{M}$ ) no ejerció un efecto neuroprotector, por lo que el autor propone que el mecanismo por el cual glutamato indujo muerte celular sería vía estrés oxidativo.

Si bien, la producción de ROS puede ser inducida por GLU, y esta a su vez puede incrementar los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmáticos, otra vía por la cual GLU puede estar incrementando la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  es por la activación de receptores metabotrópicos (mGluR), que gracias a la producción de IP<sub>3</sub>, puede movilizar  $\text{Ca}^{2+}$  desde depósitos intracelulares como el RE (Dong y cols., 2009).

Para IONO, se decidió probar las concentraciones utilizadas por Tornero y cols. (2011); 2, 5 y 10  $\mu\text{M}$  por un tiempo de 3 h sobre el mismo modelo neuronal. Al igual que lo demostrado en dicho trabajo, se observó una reducción de la VC de tipo concentración-

dependiente. Tal como se señaló anteriormente, esta inducción de muerte celular se produce por una sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular al intracelular, lo cual además se observó experimentalmente en esta tesis con la medición fluorimétrica de  $\text{Ca}^{2+}$  en células SH-SY5Y.

Los polifenoles *t*-RV y *p*-CA, estudiados en este trabajo, se pueden encontrar en una gran variedad de vegetales, y son producidos por estos como un sistema de defensa ante noxas medioambientales (Yu y cols., 2011, Shailasree y cols., 2014). RV como se mencionó anteriormente, ha demostrado poseer características benéficas sobre la salud cardiovascular y neurológica, actuando como antioxidante, antiinflamatorio, inhibidor de la agregación plaquetaria; además RV posee efectos antiproliferativos en algunos modelos de celulares de cáncer (Yu y cols., 2014). En este trabajo, y con los antecedentes obtenidos por Cárdenas (2012), *t*-RV fue utilizado para evaluar su potencial efecto neuroprotector sobre SH-SY5Y sometidas a dos estímulos de muerte por aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Tal como observó Cárdenas (2012) en su trabajo, *t*-RV a altas concentraciones ejerce efectos citotóxicos ( $10^{-4}$  M). En este trabajo también se evidenció el efecto citotóxico de *t*-RV a  $10^{-5}$  M, probablemente por la mayor sensibilidad de la técnica.

Ante la inducción de muerte con GLU, el efecto citotóxico de *t*-RV se sigue produciendo a  $10^{-5}$  y  $10^{-4}$  M en el tratamiento continuo y solo a  $10^{-4}$  M en el tratamiento conjunto. A bajas concentraciones, *t*-RV ejerce efectos protectores frente a la muerte inducida por GLU; a solo una concentración ( $10^{-10}$  M) en el tratamiento continuo y en un rango mayor en el tratamiento conjunto ( $10^{-12}$  a  $10^{-8}$  M), indicando que en el efecto de protección no estaría implicada la preincubación con *t*-RV.

El mecanismo por el cual GLU provocó la muerte de las células SH-SY5Y no implicaría la activación de receptores NMDA, dado que, si bien la estimulación con GLU aumentó la  $[\text{Ca}^{+2}]_i$ , MK801 no afectó ni la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  ni el efecto de muerte.

Se han propuesto otros dos mecanismos posibles de citotoxicidad para GLU. Según Zhong-Wei y cols. (2010), GLU puede provocar un aumento en la producción de ROS, proceso conocido como estrés oxidativo. *t*-RV es un reconocido antioxidante, capaz de atrapar radicales libres (“scavenger”). De ser el estrés oxidativo el mecanismo de muerte producido por GLU, entonces se hubiese esperado un mayor efecto protector de *t*-RV, lo cual no ocurrió en el tratamiento continuo.

Otro mecanismo propuesto es la activación de receptores metabotrópicos de GLU, y consecuentemente, la activación de IP3R, aumentando la  $[Ca^{2+}]_i$  por la liberación de este ión desde RE, organelo que lo almacena (Dong y cols., 2009); dado que *t*-RV es capaz de atravesar la membrana plasmática, podría actuar a nivel de alguno de estos receptores.

Respecto a la protección de *t*-RV frente a la inducción de muerte por IONO, en ambos tipos de tratamientos el rango de concentraciones en que el compuesto protegió fue amplio, comenzando desde  $10^{-6}$  M en el tratamiento conjunto y  $10^{-8}$  M en el continuo hasta las concentraciones más bajas probadas ( $10^{-12}$  M) en ambos casos. Existen varios mecanismos por los cuales *t*-RV pudo haber ejercido efecto protector, de las células, ya que IONO, al incrementar la  $[Ca^{2+}]_i$  aumenta la producción de ROS y radicales libres, e induce la actividad de caspasa-9 y caspasa-3, ambas enzimas implicadas en el inicio del proceso de apoptosis (Tornero y cols., 2011), pudiendo *t*-RV haber actuado sobre estos blancos.

En el caso de *p*-CA existen pocos estudios respecto a su potencial efecto neuroprotector, a pesar de ser un precursor de *t*-RV, un potente antioxidante, y de ser probado ampliamente como antineoplásico (Kilic y Yesiloglu, 2013). Hong y cols. (2012), mostraron que *p*-CA fue capaz de proteger células PC12 sometidas a muerte por el péptido  $\beta$ A (25-35), el cual incrementa la producción de ROS, la  $[Ca^{2+}]_i$  y procesos inflamatorios. En este estudio *p*-CA disminuyó la producción de ROS e inhibió significativamente la actividad de caspasa-3, enzima que, como se mencionó anteriormente, forma parte del proceso de apoptosis.

En este trabajo se observó que *p*-CA, frente a la inducción de muerte por GLU, en ambos tipos de tratamiento, no logró ejercer efecto neuroprotector. Considerando que *p*-CA, al igual que *t*-RV, es un reconocido antioxidante, es posible explicar su ineffectividad como agente protector frente a la muerte inducida por GLU, postulando que el fenómeno gatillado por GLU no involucra la generación de estrés oxidativo.

También se puede inferir que este polifenol posiblemente no tenga acción sobre receptores metabotrópicos de GLU o sobre receptores a nivel de RE, como se hipotetizó con *t*-RV.

Al contrario de lo que se observó con la muerte inducida por GLU, *p*-CA mostró una gran efectividad protegiendo a las células SH-SY5Y al ser expuestas a IONO. Esta protección se observó en todo el rango de concentraciones probado en el tratamiento continuo y a las 3 concentraciones más bajas probadas en el tratamiento continuo.. En ambos tipos de tratamiento, este polifenol fue capaz de aumentar la VC, por lo que, posiblemente su efecto se deba a la inhibición de enzimas apoptóticas como las caspasas o algún otro mecanismo relacionado que aún no ha sido descrito.

Las evidencias sobre los efectos protectores de ambos compuestos en este trabajo son amplias, tanto *t*-RV como *p*-CA fueron capaces de proteger a las células SH-SY5Y ante los estímulos de muerte que incrementaron la  $[Ca^{2+}]_i$ , sin embargo, los mecanismos por los cuales ejercieron estos efectos neuroprotectores no están dilucidados. A pesar de que se han inferido cuales podrían ser, de acuerdo a la literatura y a los estudios realizados por diversos investigadores respecto a estas moléculas, es muy importante continuar estudiando cuáles son los mecanismos que ejercen sobre blancos celulares importantes, como los receptores mitocondriales, receptores del retículo endoplásmico, proteínas buffer de  $Ca^{2+}$ , e incluso marcadores celulares de apoptosis.

La búsqueda de nuevas alternativas en la terapia de enfermedades neurodegenerativas seguirá siendo de gran importancia para la comunidad científica, debido al aumento de su

incidencia a nivel mundial, por lo que es de fundamental la realización de estudios sobre compuestos que pueden formar parte de la dieta normal del ser humano, como los polifenoles. La utilización adecuada de estos recursos puede aportar significativamente a mejorar la calidad de vida de una población que envejece progresivamente.

## CONCLUSIONES

1. El tratamiento de las células SH-SY5Y con GLU 5 mM por 24 h, induce muerte celular por aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, y no estaría mediada por receptores NMDA.
2. El tratamiento de las células SH-SY5Y con IONO 2, 5 y 10  $\mu\text{M}$  por 3 h, induce muerte celular por aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico.
3. El tratamiento de las células SH-SY5Y con *t*-RV  $10^{-5}$  y  $10^{-4}$  M por 48 h, induce muerte celular.
4. El tratamiento continuo con *t*-RV  $10^{-10}$  M induce un efecto neuroprotector en células SH-SY5Y sometidas a muerte con GLU 5 mM.
5. El tratamiento continuo con *t*-RV  $10^{-12}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$  y  $10^{-6}$  M más *p*-CA a todas las concentraciones probadas por 3 h, induce un efecto neuroprotector en células SH-SY5Y sometidas a muerte con IONO 2  $\mu\text{M}$ .
6. El tratamiento conjunto con *t*-RV  $10^{-12}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$  M por 24 h indujo un efecto neuroprotector en células SH-SY5Y sometidas a muerte con GLU 5 mM, mientras que *p*-CA no tuvo efecto.
7. El tratamiento conjunto con *t*-RV  $10^{-12}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$  M más *p*-CA a  $10^{-12}$ ,  $10^{-10}$  y  $10^{-9}$  M por 24 h indujo un efecto neuroprotector en células SH-SY5Y sometidas a muerte con IONO 2  $\mu\text{M}$ .
8. *t*-RV induce muerte a concentraciones altas, tanto de forma aislada como en presencia de GLU o IONO ( $p\text{IC}_{50}$ :  $4,578 \pm 0,1750$ ;  $p\text{IC}_{50}$ :  $4,763 \pm 0,1240$  respectivamente).

## BIBLIOGRAFÍA

- 1) Acosta D., Brusco L., Fuentes P., Guerra M., Mena R., Nitrini R., Trujillo Z., Ventura R. 2011. La enfermedad de Alzheimer: Diagnóstico y Tratamiento, una perspectiva latinoamericana. Editorial Médica Panamericana S.A. de C.V. México D.F. 2011
- 2) Aliev G., Obrenovich M., Reddy V., Shenk J., Moreira P. Nunomura A., Zhu X., Smith A., Perry G. 2008. Antioxidant therapy in Alzheimer's disease. Theory and practice. Mini Rev Med Chem. 8(13): 1395-1406.
- 3) Ansari N., Khodaghali F. 2013. Natural Products as Promising Drug Candidates for the Treatment of Alzheimer's Disease: Molecular Mechanism Aspect. Current Neuropharmacology. 11: 414-429.
- 4) Antigüedad A. 2004. Enfermedades Neurodegenerativas. Dossier Trastornos neurodegenerativos. MinusVal página 17- 19.
- 5) Bastianetto S., Ménarda C., Quirion R. 2014. Neuroprotective action of resveratrol. Biochimica et Biophysica Acta.
- 6) Boletín Informativo. 2007. Instituto Nacional de Estadísticas. URL: [www.INE.cl](http://www.INE.cl)
- 7) Boletín Informativo. 2010. Instituto Nacional de Estadísticas. URL: [www.INE.cl](http://www.INE.cl)
- 8) Borenfreund E., Babich H. 1992. Neutral red assay for toxicology in vitro. In: Watson, R.R. (Ed.) In vitro methods in toxicology. CRC Press. Boca Raton. 237-251.
- 9) Borenfreund E., Babich H., Martin-anguacil N. 1988. Comparison of two invitro cytotoxicity assays: the neutral red (NR) and tetrazolium MTT test. Toxicol In Vitro. 2(1): 1-6.
- 10) Borenfreund E., Puerner J. 1985. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for citotoxicity assay (HTD/NR-90). Journal of tissue culture methods. 9(1): 7-9.
- 11) Camandola S., Mattson P. 2011. Aberrant subcellular neuronal calcium regulation in aging and Alzheimer's disease. Biochim Biophys Acta. 1813(5): 965-973.
- 12) Cárdenas N. Efecto de *Trans*-Resveratrol sobre la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y sometida a sobrecarga de calcio. Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico. Universidad de Valparaíso. Valparaíso. 2012.
- 13) Catterall W. 2011. Voltage-gated calcium channels. Cold Spring Harb Perspect Biol. 3(8): a003947.
- 14) Corona J., Tapia R. 2005. Mecanismos de Neurodegeneración. Mensaje bioquímico XXIX.

- 15) Croce N., Bernardini S., Di Cecca S., Caltadirone C., Angelucci F. 2013. Hydrochloric acid alters the effects of L-glutamic acid on cell viability in human neuroblastoma cell cultures. *Journal of Neuroscience Methods*. 217(2013): 26-30.
- 16) Dong X., Wang X., Qin Z. 2009. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol Sin*. 30(4): 379- 387.
- 17) Florez J, Armijo J A, Mediavilla A. *Farmacología Humana 3ª edición*. Masson, S.A. España, Barcelona. 1997. Página 633.
- 18) Gambini J., López-Grueso R., Olaso-González G., Inglés M., Abdelazid K., El Alami M., Bonet-Costa V., Borrás C., Viña J. 2013. Resveratrol: distribución, propiedades y perspectivas. *Rev Esp Geriatr Gerontol*.
- 19) Gandía L., Alvarez R., Hernandez-Guijo J., González-Rubio J., De Pascual R., Rojo J., Tapia L. 2006. Anticolinesterásicos en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. *Rev Neurol*. 42(8): 471-477.
- 20) Galvao J, Davis B, Tilley M, Normando E, Duchon M, Cordeiro F. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *The FASEB Journal*. fj.13-235440
- 21) Gao M., Zhang W., Liu Q., Hu J., Liu G., Du G. 2008. Pinocembrin prevents glutamate-induced apoptosis in SH-SY5Y neuronal cells via decrease of bax/bcl-2 ratio. *European Journal of Pharmacology*. 591 (2008) 73–79
- 22) Gleichmann M., Mattson M., 2011. Neuronal Calcium homeostasis and dysregulation. *Antioxid Redox Signal*. 14(7): 1261-1273.
- 23) Granado A. Estudios de los mecanismos de acción molecular de polifenoles de la dieta en cultivos celulares y animales de experimentación. Memoria para optar al grado de doctor. Universidad Complutense de Madrid. España. 2009.
- 24) Harikumar K., Aggarwal B. 2008. Resveratrol: a multitargeted agent for age-associated chronic diseases. *Cell Cycle*. 7(8): 1020-1035.
- 25) Hong S., Jeong W., Jun M. (2012). Protective effects of the key compound isolated from *Corni fructus* against  $\beta$ -Amyloid-induced neurotoxicity in PC12 cells. *Molecules* 17: 10831-10845.
- 26) Kawamoto E., Vivar C., Camandola S. 2012. Physiology and pathology of calcium signaling in the brain. *Front Pharmacol* 3:61.

- 27) Kilic I., Yesiloglu Y. 2013. Spectroscopic studies on the antioxidant activity of p-coumaric acid. *Spectrochim Acta a Mol Biomol Spectrosc.* 115. 719-724.
- 28) Kulkarni S., Cantó C. 2014. The molecular target of Resveratrol. *Biochimica et Biophysica Acta.*
- 29) Li F., Gong Q., Dong H., Shi J. 2012. Resveratrol, a neuroprotective supplement for Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des.* 18(1): 27-33.
- 30) Martínez-Valverde I., Periago M., Ros G. 2000. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición.* 50(1): 5-18.
- 31) Ministerio de Salud de Chile MINSAL. 2014. Programa nacional de salud de personas adultas mayores.
- 32) Minta A., Kao J., Tsien R. 1989. Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *J Biol Chem.* 264(4): 8171-8178.
- 33) Organización Mundial de la Salud (OMS). 2006. Trastornos Neurológicos, desafíos para la salud pública. Capítulo 3.1 "Demencia", páginas 46-60.
- 34) Peinado M., Del Moral M., Esteban F., Martínez.Lara E., Siles E., Jiménez A., Hernández-Cobo R., Blanco S., Rodrigo J., Pedrosa A. 2000. Envejecimiento y Neurodegeneración: bases moleculares y celulares. *Revista de Neurología.* 31:1054-1065.
- 35) Pérez V., Sierra F. 2009. Biology of aging. *Rev Med Chil.* 137(2):296- 302.
- 36) Popa-Wagner A., Mirtran S., Sivanesan S., Chang E., Buga A. 2013. ROS and brain disease: the good, the bad and the ugly. *Oxid Med Cell Longev.* 2013: 963520.
- 37) Quiñones M., Miguel M., Aleixandre A. 2012. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria.* 27(1): 76-89.
- 38) Rege S., Geetha T., Griffin G., Broderick T., Babu R. 2014. Neuroprotective effects of resveratrol in Alzheimer disease pathology. *Front Aging Neurosci.* 6: 218.
- 39) Renaud S., de Longé M. 1992. Wine alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet.* 339(8808): 1523-1526.
- 40) Repetto G., del Peso A., Zurita J. 2008. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/citotoxicity. *Nat Protoc.* 3(7): 1125-1121.

- 41) Richard T., Pawlus A., Iglesias M., Pedrot E., Waffo-Teguo P., Merillon J., Monti J. 2011. Neuroprotective properties of resveratrol and derivatives. *Ann N Y Acad Sci.* 1215: 103-108.
- 42) Sayre L., Perry G., Smith M. 2008. Oxidative stress and neurotoxicity. *Chem Res Toxicol.* 21(1): 172-188.
- 43) Schaffer S., Asseburg H., Kuntz S., Muller W., Eckert G. 2012. Effects of polyphenols on brain aging and Alzheimer's disease: Focus on mitochondria. *Mol Neurobiol.* 46:161-178.
- 44) Shailasree S., Venkatarama M., Niranjana S.R., Prakash H.S. (2014). Cytotoxic effect of *p*-Coumaric acid on Neuroblastoma, N2a cell via generation of reactive oxygen species leading to dysfunction of mitochondria inducing apoptosis and autophagy. *Mol neurobiol.* DOI 10.1007.
- 45) Slachevsky A., Arriegada P., Maturana J., Rojas R. 2012. Enfermedad de Alzheimer y otras demencias. Propuesta nacional para un plan nacional de Alzheimer y otras demencias. COPRAD, Resumen ejecutivo descargado de [www.coprad.cl](http://www.coprad.cl)
- 46) Sigma-Aldrich (2010). Cell Quantification. Cook Book 12.
- 47) Supnet C., Bezprozvanny I. 2010. The dysregulation of intracellular calcium in Alzheimer's disease. *Cell Calcium.* 47(2): 183-189.
- 48) Takahashi A., Camacho P., Lechleiter J. Herman B. 1999. Measurement of intracellular calcium. *Physiol Rev.* 79(4): 1089-1125.
- 49) Tanovic A., Alfaro V. 2006. Neuroprotección con memantina (antagonista no competitivo del receptor NMDA-glutamato) frente a la excitotoxicidad asociada al glutamato en la enfermedad de Alzheimer y la demencia vascular. *Rev Neurol.* 42(10): 607-616.
- 50) Tapani E, Taavitsainen M, Lindros K, Vehmas T. 1996. Toxicity of Ethanol in Low Concentrations Experimental evaluation in cell culture. *Acta Radiologica.* 37 (6): 923-926.
- 51) Toescu E., Vreugdenhil M. 2010. Calcium and normal brain ageing. *Cell Calcium.* 47(2): 158-164.
- 52) Tornero D., Posadas I., Ceña V. 2011. Bcl-x<sub>L</sub> blocks mitochondrial inner membrane channel and prevents Ca<sup>+2</sup> overload-mediated cell death. *PLoS one.* 6(6):e20423.
- 53) Weyermann J., Lochmann D., Zimmer A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *International Journal of Pharmaceutics.* 288: 369–376

- 54) Wojda U., Salinska E., Kuznicki J. 2008. Calcium ions in neuronal degeneration. *IUBMB life*. 60(9): 575-590.
- 55) Xie H., Hu L., Li G. 2010. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chin Med J (Engl)*. 123(8): 1086-1092.
- 56) Yu W., Fu Y., Wang W. 2011. Cellular and molecular effects of resveratrol in health and disease. *Journal of cellular biochemistry*. 113: 752-759.
- 57) Zhang J., Shi J., Liu Y. 2013. Substrates and enzyme activities related to biotransformation of resveratrol from phenylalanine by *alternaria* sp. MG1. *Appl Microbiol Biotechnol*. 97(23): 9941-9954.
- 58) Zhong-Wei S., Lan Z., Shu-Jia Z., Wen-Chun C., Bing M. 2010. Excitotoxicity effects of glutamate on human neuroblastoma SH-SY5Y cells via oxidative damage. *Neurosci Bull*. 26(1): 8-16
- 59) Zundorf G., Reiser G. 2011. Calcium dysregulation and homeostasis of neural calcium in the molecular mechanisms of neurodegenerative disease provide multiple targets for neuroprotection. *Antioxid Redox Signal*. 14(7): 1275-1288.